

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
16. Januar 2003 (16.01.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 03/004510 A1**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **C07H 19/06**,  
19/10, 19/16, 19/20, 21/00

68167 Mannheim (DE). **BEIJER, Barbro** [SE/DE];  
Albert-Schweitzer-Ring 478, 69226 Nussloch (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/07389

(74) **Anwälte: WEICKMANN, Franz, Albert** usw.; Weick-  
mann & Weickmann, Postfach 860 820, 81635 München  
(DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:  
3. Juli 2002 (03.07.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
101 32 025.6 3. Juli 2001 (03.07.2001) DE  
60/314,306 24. August 2001 (24.08.2001) US

(81) **Bestimmungsstaaten (national):** AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,  
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,  
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,  
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,  
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,  
SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,  
US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(71) **Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von  
US): FEBIT AG** [DE/DE]; Käfertaler Strasse 190, 68167  
Mannheim (DE).

(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),  
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,  
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,  
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,  
SE, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,  
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) **Erfinder; und**

(75) **Erfinder/Anmelder (nur für US): GÜMIL, Ramon**  
[DE/DE]; Otto-Hahn-Platz 7, 69126 Heidelberg (DE).  
**SCHEFFLER, Matthias** [DE/DE]; Ladenburgerstrasse  
22, 69493 Hirschberg/Leutershausen (DE). **STÄH-  
LER, Peer, F.** [DE/DE]; Obere Clignetstrasse 14,

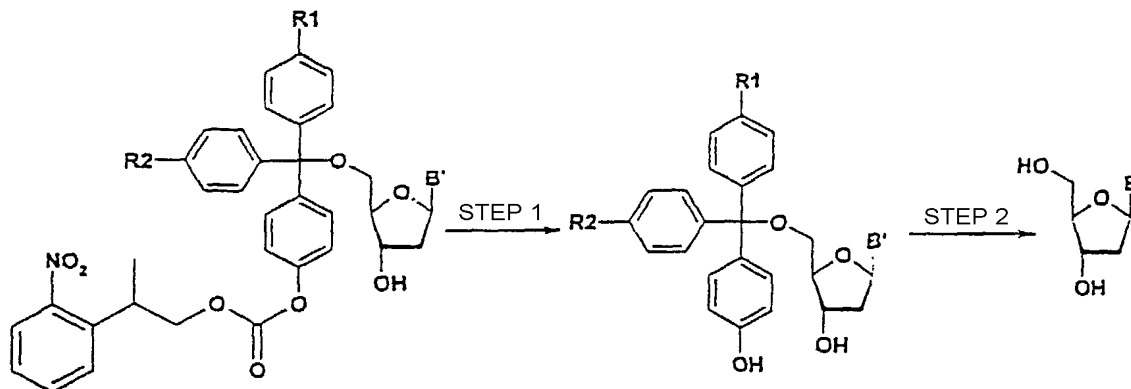
**Erklärung gemäß Regel 4.17:**

— *Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US*

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) **Title:** TWO-STAGE PROTECTIVE GROUPS FOR THE SYNTHESIS OF BIOPOLYMERS

(54) **Bezeichnung:** ZWEISTUFIGE SCHUTZGRUPPEN FÜR DIE SYNTHESE VON BIOPOLYMEREN



(57) **Abstract:** The invention relates to a method for the synthesis of biopolymers by gradual breakdown from protected synthesis building blocks carrying two-stage protective groups. The two-stage protective groups are split by means of a first exposure step and a subsequent chemical treatment step.

(57) **Zusammenfassung:** Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Synthese von Biopolymeren durch schrittweisen Aufbau aus geschützten Synthesebausteinen, die zweistufige Schutzgruppen tragen. Die zweistufigen Schutzgruppen werden durch einen ersten Belichtungsschritt und einen anschließenden chemischen Behandlungsschritt abgespalten.



WO 03/004510 A1



**Veröffentlicht:**

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.*

## Zweistufige Schutzgruppen für die Synthese von Biopolymeren

### Beschreibung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Synthese von Biopolymeren durch schrittweisen Aufbau aus geschützten Synthesebausteinen, die zweistufige Schutzgruppen tragen. Die zweistufigen Schutzgruppen werden durch einen ersten Belichtungsschritt  
10 aktiviert und einen anschließenden chemischen Behandlungsschritt abgespalten.

15

Die Technologie der lichtgesteuerten Synthese von Biopolymeren unter Verwendung fotolabiler Schutzgruppen eröffnet die Möglichkeit, Biochips in situ durch Synthese aus Monomer- und Oligomerbausteinen zu erzeugen. Biochips haben für die Forschung und Diagnostik ganz erheblich an Bedeutung gewonnen, da sie eine schnelle und hochparallele Bearbeitung komplexer biologischer Fragestellungen erlauben. Hierzu werden jedoch Chips von höchster Qualität benötigt, so dass ein hohes Interesse an neuen  
20 effektiveren Synthesemethoden besteht.

25

Bei der lichtgesteuerten Synthese von Nukleinsäure-Chips finden fotolabile Nukleosid-Derivate Verwendung. Hierbei findet der Kettenaufbau der Nukleinsäure-Fragmente üblicherweise mittels Phosphoramidit-Synthonen statt. Die Bausteine tragen jeweils eine temporäre Fotoschutzgruppe, die durch Lichteinstrahlung entfernt werden kann. Das Syntheseprinzip sieht eine zyklische Abfolge von Kondensations- und Deprotektions-Schritten (durch Licht) vor. Die Effizienz, mit der eine solche lichtgesteuerte Synthese erfolgen kann, wird im Wesentlichen durch die verwendeten  
30 fotolablen Schutzgruppen, insbesondere durch die Effizienz, mit der diese im Bestrahlungsschritt entfernt werden können, bestimmt. Bei den bislang zur lichtgesteuerten Synthese verwendeten Fotoschutzgruppen handelt es

- 2 -

sich üblicherweise um die Schutzgruppen NVOC (S. P. A. Fodor et al., Science 251 (1991), 767 ff.), MeNPOC (A. C. Pease et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 91 (1994), 5022 ff.), DMBOC (M. C. Pirrung, J. Chem. 60 (1995), 1116 ff.) und NPPOC (A. Hassan et al., Tetrahedron 53 (1997), 4247 ff.). Weitere bekannte fotolabile Schutzgruppen in der Nukleosid- bzw. Nukleotidchemie sind o-Nitrobenzyl-Gruppen und ihre Derivate (vgl. z.B. Pillai, Org. Photochem. 9 (1987), 225; Walker et al., J. Am. Chem. Soc. 110 (1988), 7170). Als weitere fotolabile Schutzgruppe wurde die 2-(o-Nitrophenyl)ethyl-Gruppe (Pfleiderer et al., In: "Biosphosphates and their Analogues - Synthesis, Structure, Metabolism and Activity", ELSEVIER Science Publishers B.V. Amsterdam (1987), 133 ff.) sowie Derivate davon (WO97/44345 und WO96/18634) vorgeschlagen.

Die gegenwärtig für die lichtgesteuerte Synthese von Nukleinsäuren verwendeten fotolabilen Schutzgruppen. (z.B. NVOC, MeNPOC, NPPOC) zeichnen sich im Allgemeinen durch einen vergleichsweise niedrigen Absorptionskoeffizienten bei der Wellenlänge der Lichteinstrahlung aus. Die Bestrahlung der fotolabilen Nukleosid-Derivate erfolgt üblicherweise mit Hg-Hochdrucklampen bei einer Wellenlänge von 365 nm. Der niedrige Absorptionskoeffizient der verwendeten fotolabilen Schutzgruppe bei dieser Wellenlänge hat zur Folge, dass nur ein sehr geringer Anteil des eingestrahnten Lichts zur Anregung der Moleküle verwertet werden kann. Desweiteren handelt es sich bei den verwendeten fotolabilen Schutzgruppen zumeist um farblose Derivate. Dies wiederum hat zur Folge, dass es während der Synthese nicht möglich ist, mit einfachen spektroskopischen Methoden zu detektieren, ob die fotolabile Schutzgruppe sich noch am Nukleosid-Derivat befindet oder bereits teilweise oder vollständig durch den Lichteintrag abstrahiert worden ist. Es lässt sich somit der Vorgang der Abstraktion nur schwer oder gar nicht verfolgen.

30

Muller et al. (Helvetica Chim. Acta 84 (2001), 3735-3741) beschreiben eine fotolabile Schutzgruppe, bestehend aus einer MeNPOC-Gruppe, an die

- 3 -

ein fluoreszierendes Coumarinderivat über einen Aminolinker gekoppelt ist. Diese fotolabile Schutzgruppe wird zur Synthese von Oligonuklotiden auf DNA-Microarrays eingesetzt. Die Abspaltung der fotolabilen Schutzgruppe erfolgt in einem einzigen Schritt durch Bestrahlung.

5

Gemäß vorliegender Erfindung wird eine neuartige Schutzgruppe bereitgestellt, bei der der Aktivierungsschritt lichtinduziert erfolgt und der eigentliche Entschützungsprozess am Reaktionszentrum durch chemische Mittel, z.B. säurekatalysiert, stattfindet (Abb. 1). Diese neuartige Schutzgruppe bzw. diese Schutzgruppe tragende Moleküle können für die Synthese von Biopolymeren eingesetzt werden.

10

Ein Gegenstand der Erfindung ist somit ein Verfahren zur Synthese von Biopolymeren durch schrittweisen Aufbau aus Synthesebausteinen, die Schutzgruppen tragen, wobei man mindestens einen Synthesebaustein verwendet, der eine zweistufige Schutzgruppe trägt, die durch einen Belichtungsschritt aktiviert und durch einen anschließenden chemischen Behandlungsschritt abgespalten wird. Der chemische Behandlungsschritt umfasst vorzugsweise eine Behandlung mit Base, eine Behandlung mit Säure, eine Oxidation, eine Reduktion oder/und eine enzymatische Reaktion. Besonders bevorzugt umfasst der chemische Behandlungsschritt eine Säurebehandlung.

15

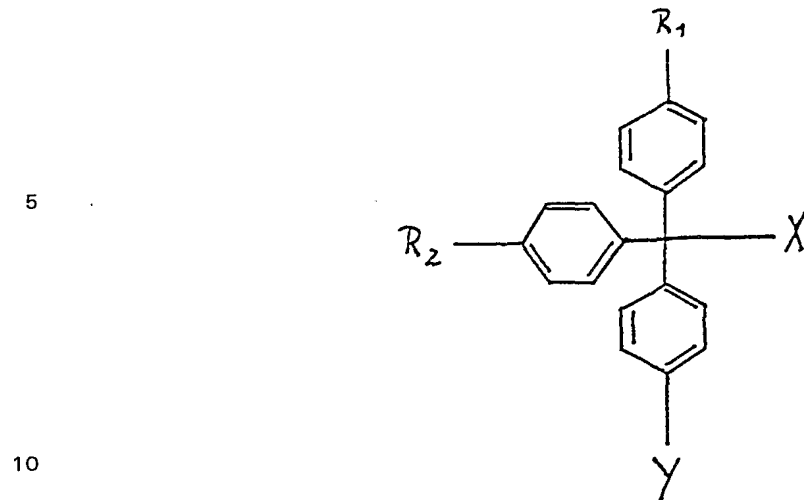
20

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung verwendet man als zweistufige Schutzgruppe eine derivatisierte Tritylgruppe. Tritylgruppen zeichnen sich durch ihre hervorragenden Abspaltbarkeit, insbesondere durch Behandlung mit Säure, aus. Die erfindungsgemäßen zweistufigen Tritylschutzgruppen sind hingegen nicht säurelabil, sondern werden erst nach Aktivierung und Abspaltung einer oder mehrerer fotolabiler Komponenten in eine säurelabile Form überführt. Besonders bevorzugt wird daher ein Synthesebaustein mit einer zweistufigen Schutzgruppe verwendet, der die allgemeine Formel I aufweist:

25

30

- 4 -



wobei  $R_1$  und  $R_2$  jeweils unabhängig ausgewählt sind aus Wasserstoff,  $OR_3$ ,  
 15  $O(CH_2)_nCOOR_3$  und  $NHZ$ ,  $R_3$  eine  $C_1$ - $C_8$  Alkylgruppe, eine  $C_2$ - $C_8$ -  
 Alkenylgruppe, eine  $C_2$ - $C_8$ -Alkynylgruppe oder/und eine  $C_6$ - $C_{20}$  Arylgruppe  
 enthält, die gegebenenfalls einen oder mehrere Substituenten aufweisen  
 kann,  $X$  den Synthesebaustein darstellt,  $Y$  jeweils unabhängig eine  
 fotoaktivierbare Schutzgruppe ist,  $Z$  eine Aminoschutzgruppe ist,  $n$  eine  
 20 ganze Zahl von 0 bis 4 ist und wobei gegebenenfalls  $R_1$  oder/und  $R_2$  durch  
 $Y$  ersetzt sein können.

Die Alkyl-, Alkenyl- und Alkynylgruppen können linear oder cyclisch,  
 geradkettig oder verzweigt sein. Bevorzugte Bedeutungen für  $R_1$  und  $R_2$   
 25 sind Wasserstoff, O-Methyl,  $OCOO$ -Methyl oder eine geschützte  
 Aminogruppe, z.B. eine mit einer geeigneten Carbonsäure in eine  
 Amidfunktion überführte Aminogruppe.

Die Erfindung erfasst auch Verbindungen, die mehrere fotoaktivierbare  
 Schutzgruppen tragen, insbesondere Verbindungen der Formel I, worin  
 30 zumindest einer von  $R_1$  oder  $R_2$  durch eine fotoaktivierbare Schutzgruppe  $Y$   
 ersetzt ist.

- 5 -

Durch Variation der Reste  $R_1$  und  $R_2$  und Substitution eines oder beider Reste durch fotoaktivierbare Schutzgruppen lässt sich die Säurelabilität den gewünschten Anforderungen anpassen.

5 Die Erfindung umfasst auch Verbindungen, die eine oder mehrere fluoreszierende Gruppen tragen, z.B. Verbindungen, bei denen Y eine fluoreszierende Fotoschutzgruppe oder/und  $R_3$  bzw. Z fluoreszierende Gruppen darstellen (R. Ramage, F.O. Wahl, Tetrahedron Lett., 34 (1993), 7133) oder Moleküle, bei denen die Fluoreszenz durch Substitution am  
10 Tritylgerüst (J.L. Fourrey et al., Tetrahedron Lett., 28 (1987), 5157) eingeführt wurde.

Diese fluoreszierenden Gruppen können, solange die Anregungs- und Emissionswellenlängen mit der lichtinduzierten Aktivierung nicht  
15 interferieren, zur Qualitätskontrolle von Biochips herangezogen werden. Dies kann beispielsweise in Biochip-Trägern gemäß WO 00/13018 geschehen.

Die fotoaktivierbare Gruppe Y der zweistufigen Schutzgruppe kann  
20 grundsätzlich aus beliebigen bekannten Fotoschutzgruppen ausgewählt werden, wie etwa Nitroveratryloxycarbonyl (NVOC),  $\alpha$ -Methyl-6-nitropiperonyloxycarbonyl (MeNPOC), 3,5-Dimethoxybenzoincarbonat (DMBOC), 2-(o-Nitrophenyl)propyloxycarbonyl (NPPOC), o-Nitrobenzyl und Derivaten davon, 2-(o-Nitrophenyl)ethyl und Derivaten davon.

25 Falls mehrere fotoaktivierbare Gruppen Y vorhanden sind, können diese gleich oder verschieden sein.

Die fotoaktivierbare Komponente Y der zweitstufigen Schutzgruppe kann  
30 durch einen Belichtungsschritt abgespalten werden. Durch Abspaltung der Gruppe Y wird die Labilität der verbleibenden Schutzgruppe erhöht, so dass sie durch einen anschließenden chemischen Behandlungsschritt

- 6 -

abgespalten werden kann, während eine zweistufige Schutzgruppe, welche die fotoaktivierbare Komponente Y noch enthält, unter derartigen Bedingungen im Wesentlichen gegenüber einer Abspaltung resistent ist.

5 Das erfindungsgemäße Verfahren wird zur Synthese von Biopolymeren eingesetzt, wobei das zu synthetisierende Biopolymer schrittweise aus mehreren Synthesebausteinen aufgebaut wird. Besonders bevorzugt wird das Verfahren zur Synthese von Nukleinsäuren, z.B. DNA oder RNA, eingesetzt. Es ist jedoch anzumerken, dass das Verfahren auch zur  
10 Synthese von anderen Biopolymeren, wie etwa Peptiden, Peptidnukleinsäuren (PNA) oder Sacchariden, geeignet ist. Der Synthesebaustein kann ein monomerer Baustein, z.B. ein Nukleosid-Derivat, aber auch ein oligomerer Baustein, z.B. ein Dimer oder Trimer, d.h. beispielsweise ein Di- oder Trinukleosid-Derivat, sein. Besonders bevorzugt  
15 ist der Synthesebaustein ein Phosphoramidit-Baustein. Es können jedoch auch andere Nukleotidsynthese-Bausteine, z.B. Phosphat- oder Phosphonat-Bausteine, verwendet werden. Weiterhin können als Synthesebausteine auch Linker- bzw. Spacer-Bausteine, z.B. als Phosphoramidite, eingesetzt werden. Besonders bevorzugte Linker bzw. Spacer als Träger zweistufiger  
20 Schutzgruppen sind in DE 100 41 539.3 beschrieben.

Die erfindungsgemäßen, eine zweistufige Schutzgruppe tragenden Synthesebausteine haben im Allgemeinen stärker lipophile Eigenschaften als die bislang die im Stand der Technik verwendeten Synthesebausteine.  
25 Durch diese Lipophilie erhöht sich die Solubilität der Synthesebausteine, insbesondere der Phosphoramidit-Synthone in organischen Lösungsmitteln. Die dadurch mögliche homogenere Reaktionsführung führt im Vergleich zu den reinen fotolabilen Phosphoramidit-Synthonen zu einer höheren Kopplungseffizienz. Durch die Abspaltung des farbigen Tritylkations der  
30 erfindungsgemäßen Fotoschutzgruppen, welches einen wesentlich höheren Absorptionskoeffizienten besitzt als die Abspaltungsprodukte bei anderen Fotoentschützungsprozessen, eröffnet sich weiterhin die Möglichkeit zur



- 7 -

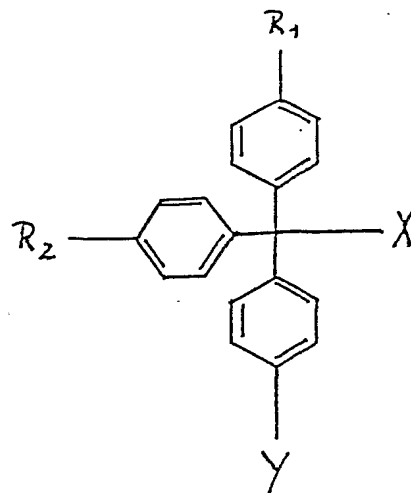
direkten online Prozesskontrolle. Dies führt zu einer Verbesserung bei der Qualitätskontrolle für Biochips.

Die Tritylgruppe der erfindungsgemäßen Fotoschutzgruppen ermöglicht außerdem die selektive Funktionalisierung der 5'-Hydroxyfunktion. Dies führt zu einer enormen Kostenreduzierung, da eine Trennung der 3'-5'-Isomere entfällt.

Besonders bevorzugt sind daher gemäß vorliegender Erfindung Phosphoramidit-Bausteine, die die zweistufige Schutzgruppe am 5'-O-Atom des Zuckers, insbesondere der Ribose oder der Deoxyribose, tragen.

Die Synthese der Biopolymeren kann auf übliche Weise durchgeführt werden, beispielsweise auf einer Festphase. Besonders bevorzugt werden mehrere Biopolymere, die eine unterschiedliche Sequenz von Synthesebausteinen tragen, auf einem einzigen Träger in Form eines Array in situ erzeugt.

Noch ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Verbindungen der allgemeinen Formel I



- 8 -

wobei  $R_1$  und  $R_2$  jeweils unabhängig ausgewählt sind aus Wasserstoff,  $OR_3$ ,  $O(CH_2)_nCOOR_3$  und  $NHZ$ ,  $R_3$  eine  $C_1$ - $C_8$  Alkylgruppe oder/und eine  $C_6$ - $C_{20}$  Arylgruppe enthält, die gegebenenfalls Substituenten aufweisen kann,  $X$  einen Synthesebaustein zur Synthese von Biopolymeren oder eine  
5 Abgangsgruppe darstellt,  $Y$  jeweils unabhängig eine fotoaktivierbare Schutzgruppe ist,  $Z$  eine Aminoschutzgruppe ist,  $n$  eine ganze Zahl von 0 bis 4 ist und wobei gegebenenfalls  $R_1$  oder/und  $R_2$  durch  $Y$  ersetzt sein können.

10 Substituenten von Alkyl-, Alkenyl-, Alkynyl- bzw. Arylgruppen sind vorzugsweise ausgewählt aus Halogenen, z.B. F, Cl, Br oder I, OH, SH, -O-, -S-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>-, NO<sub>2</sub>, CN und NHZ, wobei Z eine Aminoschutzgruppe ist. Die Substituenten können an dem betreffenden Rest einfach oder mehrfach vorliegen. Arylgruppen können auch  
15 Ringsysteme mit Heteroatomen, wie etwa O, N oder/und S, umfassen. Alkyl-, Alkenyl- und Alkynylgruppen können in geradkettiger, verzweigtkettiger oder cyclischer Form vorliegen und gegebenenfalls mit einer  $C_6$ - $C_{20}$ -Arylgruppe substituiert sein, wobei die Arylgruppe wiederum Substituenten wie zuvor angegeben enthalten kann. Substituenten von  
20 Arylgruppen werden z.B. ausgewählt aus -OH, Halogen, - $C_1$ - $C_4$ -Alkyl, -O- $C_1$ - $C_4$ -Alkyl, wobei die Alkylgruppen wie zuvor angegeben substituiert sein können.

Wenn X eine Abgangsgruppe ist, handelt es sich um eine Gruppe, die bei  
25 einer Reaktion der Verbindung (I) mit einer anderen Verbindung abgespalten werden kann. Vorzugsweise ist X eine durch Reaktion mit einer Nukleophil, gegebenenfalls in Gegenwart einer Hilfsbase, wie Pyridin, abspaltbare Abgangsgruppe. Bevorzugte Beispiele für X sind: Cl, Br, I, Tosylat, Mesylat, Trifluorsulfonat etc.

30

Die schematische Darstellung des erfindungsgemäßen Schutzgruppenkonzepts ist in **Abbildung 1** gezeigt. Der Synthesebaustein

- 9 -

(A) trägt eine zweistufige Schutzgruppe (B-C). In einem ersten Belichtungsschritt wird der fotolabile Anteil (B) der Schutzgruppe abgespalten. Durch einen zweiten chemischen Behandlungsschritt, z.B. durch Zugabe von Säure, wird die chemisch labile Komponente (C) der Schutzgruppe abgespalten, so dass der Synthesebaustein (A) in aktiver Form vorliegt.

**Abbildung 2** zeigt eine Beispielsubstanz aus einer bevorzugten Klasse von erfindungsgemäßen zweistufigen Schutzgruppen. Sie basiert auf der säurelabilen Tritylgruppe, enthält jedoch in der p-Position eines Phenylrests eine fotolabile Komponente (hier die NPPOC-Gruppe), welche die Säureempfindlichkeit der Tritylgruppe verringert bzw. vollständig blockiert. Durch Belichtung und Abspaltung der fotolabilen Komponente wird die Schutzgruppe in eine säurelabile Form überführt und kann anschließend in Gegenwart von Säure unter Freisetzung des ungeschützten Synthesebausteins abgespalten werden.

**Abbildung 3** zeigt zwei Varianten zur Synthese einer erfindungsgemäßen zweistufigen Schutzgruppe.

**Abbildung 4** zeigt zwei weitere Varianten zur Herstellung erfindungsmäßiger Synthesebausteine mit zweistufigen Schutzgruppen.

**Abbildung 5** zeigt eine dritte Variante der Synthese zweistufiger Schutzgruppen, wobei zwei der Phenylgruppen an der Tritylgruppe mit einer fotolabilen Gruppe substituiert sind.

**Abbildung 6** zeigt konkrete Ausführungsformen für Carbonatderivate der zweistufigen Schutzgruppe und

**Abbildung 7** zeigt ein Verfahren zur Synthese der S1-Schutzgruppe. Ausgehend von 4-Hydroxybenzoesäureethylester und tert.-

- 10 -

Butoxydiphenylchlorsilan in Anwesenheit von Imidazol, gelingt die quantitative Einführung der Silylgruppe. Der silylderivatisierte Ester wird mit dem Grignard-Reagenz des Brombenzols zum 4-(tert.- Butoxydiphenylsilyloxy)triphenylcarbinol (S1) umgesetzt. In analoger Weise gelangt man  
5 durch Verwendung des Bromanisols zum 4,4'-Dimethoxy-4''- (tert.- Butoxydiphenylsilyloxy)tritylcarbinol (S3, ohne Abb.).

**Abbildung 8A** zeigt die Synthese der S2-Schutzgruppe.

Das Methoxy-Silyloxy-Derivat ist, ausgehend von silylgeschütztem  
10 4-Hydroxybenzophenon, welches in Analogie zum Hydroxybenzoesäureethylester in Gegenwart von Imidazol synthetisiert wird, durch Umsetzung mit dem Grignard-Reagenz des Bromanisols zum 4-tert.-Butoxydiphenylsilyloxytriphenylcarbinol (S2) zugänglich.

15 **Abbildung 8B** zeigt ein Syntheschema für S4/5, R = H oder OMe.

Die Darstellung der Di-Silyloxy-Tritylcarbinolderivate (S4,5) erfolgt durch Umsetzung eines geschützten 4,4'-Dihydroxybenzophenons, welches entweder mit Brombenzol (R = H) oder mit Bromanisol (R = OMe) reagiert.

20 **Abbildung 9** zeigt die Synthese der S6-Schutzgruppe.

Die Tri-Silyloxy-Tritylcarbinolvariante (S6) wird entweder durch die Umsetzung von 4'-Silyloxy-Brombenzol mit 4'-Silylbenzoesäureethylester oder durch Umsetzung von 4,4'-Disilyloxybenzophenon und 4'-Silyloxybrombenzol hergestellt.

25 Die Abspaltung der tert.-Butoxydiphenylsilylgruppe aus den Silylgeschützten Verbindungen kann durch einstündige Reaktion mit TBAF; Reaktionsabbruch durch Zugabe von Pyridin/Methanol/Wasser und Pyridinium-DOWEX erfolgen. Die Derivate können meist direkt mit Nppoc-Cl  
30 umgesetzt werden.

- 11 -

Bei der anschließenden Halogenierung der Carbinole zeigen sich unterschiedliche Eigenschaften, die durch die Variation der elektronenziehenden- bzw. elektronenschiebenden Substituenten in para-Stellung hervorgerufen werden.

5

Der Austausch des Alkohols durch ein Halogenid erfolgt nach dem Mechanismus der nukleophilen Substitution 1.Ordnung. Daraus ergibt sich, dass alle Prozesse über ein trigonalplanares Carbeniumion verlaufen. Entscheidend für diesen Mechanismus ist die Stabilität des Kations, dessen Struktur und die Möglichkeit zur Delokalisation der  $\pi$ -Elektronen. Zusätzlich wird es durch elektronenschiebende Substituenten stabilisiert und durch elektronenziehende Substituenten destabilisiert. In diesem Fall geht die Stabilität des Kations direkt mit der Säurebeständigkeit der Schutzgruppe einher. Je stabiler das Kation, desto säurelabiler sind die korrespondierenden Schutzgruppen.

10

15

In der Literatur sind eine Reihe von Standardverfahren beschrieben, die zur Halogenierung von Triphenylcarbinolderivaten herangezogen werden. Erfahrungen mit pyrensubstituierten Dimethoxytritylcarbinolen zeigen, dass sich extrem elektronenreiche Verbindungen innerhalb von Minuten mit Acetylchlorid in Cyclohexan quantitativ chlorieren lassen. Für ausgewählte Schutzgruppen mit elektronenziehenden Para-Substituenten zeigt es sich, dass mit refluxierendem  $\text{SOCl}_2$  gute Umsätze erzielt werden.

20

25

**Abbildung 10** zeigt die Herstellung von geschützten Thymidinderivaten. Für Verbindungen mit mehreren Nppoc-Gruppen werden geringere Ausbeuten erhalten. Unter Verwendung von refluxierendem Acetylbromid bzw.  $\text{SOBr}_2$  ist es gelungen, die Halogenderivate in Anwesenheit mehrerer Nppoc- Substituenten im analytischen Maßstab darzustellen und ohne weitere Aufarbeitung mit Thymidin umzusetzen.

30

- 12 -

**Abbildung 11** zeigt ein weiteres Verfahren zur Synthese von Nukleotiden, die eine zweistufige Schutzgruppe tragen.

**Abbildung 12** und **Abbildung 13** zeigen Verfahren zur Herstellung von Nukleotiden, die eine zweistufige Schutzgruppe tragen, ausgehend von Rosolsäure.

Ausgehend von der Rosolsäure gelangt man zu dem Tri-Nppoc-Trityl-Thymidin in einer Eintopfreaktion. Bei diesem Ansatz kann auf die Verwendung teurer Schutzgruppen verzichtet werden. Als Modellverbindung für diesen Reaktionstyp diene das Tri-Pivaloyl-Tritylderivat.

Die Reaktion läuft in einem polar aprotischen Lösungsmittel bei 50 °C innerhalb von Minuten über eine Zwischenstufe, die dann mit den entsprechenden Nukleosiden zu den tandemgeschützten Derivaten weiterreagiert. Die Darstellung erfolgt im präparativen Maßstab.

## Beispiele

### Beispiel 1: Synthese von Tandemschutzgruppen

#### 1.1 4-(tert.Butoxydiphenylsilyloxy)-triphenylcarbinol (S1)

In einem ausgeheizten Kolben wurden 0,61 g (25,00 mmol, 2,1 eq) Magnesium mit 20 ml THF unter Argon suspendiert. 6,28 g (40,00 mmol, 3,4 eq) Brombenzol wurden mit einem Tropftrichter langsam unter konstantem Sieden zugetropft. Nach Beendigung der Zugabe wurde mit einem Ölbad auf 85 °C erhitzt und 15 min lang nachgerührt. Das entstandene Magnesiumbromid wurde auf 70 °C abkühlen gelassen und 5,00 g (11,89 mmol, 1 eq) 4-tert. Butoxydiphenylsilyloxybenzoesäureethylester gelöst in 20 ml THF zugetropft und für weitere 1,5 h bei

- 13 -

- 85 °C erwärmt. Anschließend wurde der Ansatz erkalten gelassen und mit gesättigter Amoniumchlorid-Lösung abgebrochen. Zum Extrahieren wurden 500 ml Ethylacetat zugegeben und 2x mit Amoniumchlorid-Lösung (sat.) und 1x mit Natriumchlorid-Lösung (sat.) extrahiert. Die organische Phase wurde mit Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel 40-63 µm mit dem Eluent Ethylacetat/n-Hexan + 1% TEA (1:7) gereinigt. Man erhält das 4-(tert. Butoxydiphenylsilyloxy)-triphenylcarbinol als weißen pulvrigen Feststoff.
- Ausbeute: 5,75 g ≈ 91 % d. Th.

R<sub>f</sub>-Wert (Ethylacetat / n-Hexan 1:7 + 1% TEA): 0,19

## 1.2 4,4'-Dimethoxy-4''-(tert.butoxydiphenylsilyloxy)-triphenylcarbinol (S3)

- In einem ausgeheizten Kolben wurden 2,78 g (114,14 mmol, 2,4 eq) Magnesium mit 80 ml THF unter Argon suspendiert. 26,68 g (142,67 mmol, 3,0 eq) Bromanisol wurden mit einem Tropftrichter langsam unter konstantem Sieden zugetropft. Nach Beendigung der Zugabe wurde mit einem Ölbad auf 85 °C erhitzt und 15 min lang nachgerührt. Das entstandene Magnesiumbromid wurde auf 70 °C abkühlen gelassen und 20,00 g (47,56 mmol, 1 eq) 4-tert. Butoxydiphenylsilyloxybenzoesäureethylester gelöst in 100 ml THF zugetropft und für weitere 2 h bei 85 °C erwärmt. Anschließend wurde der Ansatz erkalten gelassen und mit gesättigter Amoniumchlorid-Lösung abgebrochen. Zum Extrahieren wurden 500 ml Ethylacetat zugegeben und 2x mit Amoniumchlorid-Lösung (sat.) und 1x mit Natriumchlorid-Lösung (sat.) extrahiert. Die organische Phase wurde mit Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch nach dem Stufengradientenverfahren an Kieselgel 40-63 µm mit dem Eluent Ethylacetat/n-Hexan + 1 % TEA (1:5

- 14 -

und 1:3) gereinigt. Man erhält das 4,4'-Dimethoxy-4''-(tert.butoxydiphenylsilyloxy)-triphenylcarbinol als weißen pulverigen Feststoff.

Ausbeute: 25,65 g  $\approx$  97 % d. Th.

5

$R_f$ -Wert (Ethylacetat / n-Hexan 1:3 + 1 % TEA): 0,59

### 1.3 4-Methoxy-4'-(tert.butoxydiphenylsilyloxy)-triphenylcarbinol (S2)

In einem ausgeheizten Kolben wurden 0,64 g (26,51 mmol, 1,2 eq) Magnesium mit 20 ml THF unter Argon suspendiert. 6,20 g (33,14 mmol, 1,5 eq) Bromanisol wurde mit einem Tropftrichter langsam unter konstantem Sieden zugetropft. Nach Beendigung der Zugabe wurde mit einem Ölbad auf 85 °C erhitzt und 15 min lang nachgerührt. Das entstandene Magnesiumbromid wurde auf 70 °C abkühlen gelassen und 10,00 g (22,09 mmol, 1 eq) 4-tert.Butoxydiphenylsilyloxybenzophenon gelöst in 50 ml THF zugetropft und für weitere 2 h bei 70 °C erwärmt. Anschließend wurde der Ansatz erkalten gelassen und mit gesättigter Amoniumchlorid-Lösung abgebrochen. Zum Extrahieren wurden 250 ml Ethylacetat zugegeben und 2x mit Amoniumchlorid-Lösung (sat.) und 1x mit Natriumchlorid-Lösung (sat.) extrahiert. Die organische Phase wurde mit Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Auf eine Aufarbeitung wurde verzichtet. Man erhält das 4-Methoxy-4'-(tert. Butoxydiphenylsilyloxy)-triphenylcarbinol.

25 Ausbeute: quantitative Umsetzung

$R_f$ -Wert (Ethylacetat / n-Hexan 1:3 + 1 % TEA): 0,58

### 1.4 4,4'-Di-(tert.butoxydiphenylsilyloxy)-triphenylcarbinol (S4)

30 In einem ausgeheizten Kolben wurden 0,20 g (8,28 mmol, 1,2 eq) Magnesium mit 20 ml THF unter Argon suspendiert. 1,63 g (10,35 mmol, 1,5 eq) Brombenzol wurde mit einem Tropftrichter langsam unter



- 15 -

konstantem Sieden zugetropft. Nach Beendigung der Zugabe wurde mit einem Ölbad auf 85 °C erhitzt und 15 min lang nachgerührt. Das entstandene Magnesiumbromid wurde auf 70 °C abkühlen gelassen und 5,00 g (6,90 mmol, 1 eq) 4,4'-di-tert.Butoxydiphenylsilyloxybenzophenon  
5 gelöst in 50 ml THF zugetropft und für weitere 2 h bei 70 °C erwärmt. Anschließend wurde der Ansatz erkalten gelassen und mit gesättigter Amoniumchlorid-Lösung abgebrochen. Zum Extrahieren wurden 250 ml Ethylacetat zugegeben und 2x mit Amoniumchlorid-Lösung (sat.) und 1x mit Natriumchlorid-Lösung (sat.) extrahiert. Die organische Phase wurde  
10 mit Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel 40-63 µm mit dem Eluent Ethylacetat/n-Hexan + 1 % TEA (1:7) gereinigt. Man erhält das 4,4'-Di-(tert. butoxydiphenylsilyloxy)-triphenylcarbinol als weißen pulvrigen Feststoff.

15 Ausbeute: 3,00 g ≈ 54 % d. Th.

R<sub>f</sub>-Wert (Ethylacetat / n-Hexan 1:7 + 1 % TEA): 0,27.

### 1.5 4,4'-Di-(tert.butoxydiphenylsilyloxy)-4''-methoxy-triphenylcarbinol (S5)

20

In einem ausgeheizten Kolben wurden 0,20 g (8,28 mmol, 1,2 eq) Magnesium mit 20 ml THF unter Argon suspendiert. 1,94 g (10,35 mmol, 1,5 eq) Bromanisol wurde mit einem Tropftrichter langsam unter konstantem Sieden zugetropft. Nach Beendigung der Zugabe wurde mit  
25 einem Ölbad auf 85 °C erhitzt und 15 min lang nachgerührt. Das entstandene Magnesiumbromid wurde auf 70 °C abkühlen gelassen und 5,00 g (6,90 mmol, 1 eq) 4,4'-Di-tert.butoxydiphenylsilyloxybenzophenon gelöst in 50 ml THF zugetropft und für weitere 2 h bei 70 °C erwärmt. Anschließend wurde der Ansatz erkalten gelassen und mit gesättigter  
30 Amoniumchlorid-Lösung abgebrochen. Zum Extrahieren wurden 250 ml Ethylacetat zugegeben und 2x mit Amoniumchlorid-Lösung (sat.) und 1x mit Natriumchlorid-Lösung (sat.) extrahiert. Die organische Phase wurde

- 16 -

mit Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel 40-63  $\mu\text{m}$  mit dem Eluent Ethylacetat/n-Hexan + 1 % TEA (1:5) gereinigt. Man erhält das 4,4'-Di-(tert.butoxydiphenylsilyloxy)-4''-methoxy-triphenylcarbinol als weißen pulvrigen Feststoff.

Ausbeute: 3,00 g  $\approx$  52 % d. Th.

$R_f$ -Wert (Ethylacetat / n-Hexan 1:5 + 1 % TEA): 0,26

### 1.6 4,4',4''-Tri-(tert.butoxydiphenylsilyloxy)-triphenylcarbinol (S6)

In einem ausgeheizten Kolben wurden 0,41 g (16,87 mmol, 1,2 eq) Magnesium mit 20 ml THF unter Argon suspendiert. 18,90 g (20,86 mmol, 1,5 eq) 4-tert.Butoxydiphenylsilyloxybrombenzol wurde mit einem Tropftrichter langsam unter konstantem Sieden zugetropft. Nach Beendigung der Zugabe wurde mit einem Ölbad auf 85 °C erhitzt und 15 Minuten lang nachgerührt. Das entstandene Magnesiumbromid wurde auf 70 °C abkühlen gelassen und 1 eq 10,10 g (13,97 mmol) 4,4'-di-tert.Butoxydiphenylsilyloxybenzophenon gelöst in 50 ml THF zugetropft und für weitere 2 h bei 70 °C erwärmt. Anschließend wurde der Ansatz erkalten gelassen und mit gesättigter Amoniumchlorid-Lösung abgebrochen. Zum Extrahieren wurden 250 ml Ethylacetat zugegeben und 2x mit Amoniumchlorid-Lösung (sat.) und 1x mit Natriumchlorid-Lösung (sat.) extrahiert. Die organische Phase wurde mit Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel 40-63  $\mu\text{m}$  mit dem Eluent Ethylacetat/n-Hexan + 1 % TEA (1:10) gereinigt. Man erhält das 4,4',4''-Tri-(tert.Butoxydiphenylsilyloxy)-triphenylcarbinol als weißen pulvrigen Feststoff.

Ausbeute: 10,20 g  $\approx$  68 % d. Th.

$R_f$ -Wert (Ethylacetat / n-Hexan 1:10 + 1 % TEA): 0,23

- 17 -

**1.7 4-(2-[2-Nitrophenyl]-propyloxycarbonyloxy)-triphenylcarbinol**

Zu 2,87 g (5,41 mmol, 1 eq) 4-tert.Butoxydiphenylsilyloxytriphenylcarbinol gelöst in 20 ml THF wurden 6,00 ml (6,00 mmol, 1,1 eq) einer 1M-TBAF-Lösung getropft und 1 h bei Raumtemperatur (RT) gerührt. Um die Reaktion  
5 abubrechen wurden 5 ml Pyridin/MeOH/Wasser (3:1:1) und Pyridinium-Dowex zugegeben. Nach 30 min wurde abfiltriert und mit Pyridin gespült. Anschließend wurde die Lösung mehrmals mit Pyridin coevaporiert. Zu dem in 60 ml Pyridin/Methylenchlorid (2:1) gelösten Ansatz wurden 1,97 g (8,12 mmol, 1,5 eq) Nppoc-Cl gelöst in 10 ml Methylenchlorid getropft und  
10 16 h bei RT gerührt. Danach wurde eingengt und in Methylenchlorid aufgenommen, 2x mit Natriumhydrogencarbonat-Lösung (1N) und 1x mit Natriumchlorid-Lösung (sat.) extrahiert. Die organische Phase wurde getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel 40-63  $\mu$ m mit dem Eluent  
15 Ethylacetat/n-Hexan + 1 % TEA (1:2) gereinigt. Man erhält das 4-Nppoc-triphenylcarbinol als weißen festen Schaum.

Ausbeute: 2,16 g  $\approx$  83 % d. Th.

20  $R_f$ -Wert (Ethylacetat / n-Hexan 1:1 + 1 % TEA): 0,68

**1.8 4-Methoxy-4'-(2-[2-nitrophenyl]-propyloxycarbonyloxy)-triphenylcarbinol (S2)**

Zu 8,00 g (14,27 mmol, 1 eq,) 4-Methoxy-4'-tert.Butoxydiphenylsilyloxytriphenylcarbinol gelöst in 50 ml THF wurden 15,70 ml (15,70 mmol,  
25 1,1 eq) 1M-TBAF-Lösung getropft und für 1 h bei RT gerührt. Um die Reaktion abubrechen wurden 20 ml Pyridin/MeOH/Wasser (3:1:1) und Pyridinium-Dowex zugegeben. Nach 30 min wurde abfiltriert und mit Pyridin gespült. Anschließend wurde die Lösung mehrmals mit Pyridin  
30 coevaporiert. Zu dem in 60 ml Pyridin/Methylenchlorid (2:1) gelösten Ansatz wurden 6,50 g (26,75 mmol, 1,9 eq) Nppoc-Cl gelöst in 15 ml Methylenchlorid getropft und 16 h bei RT gerührt. Danach wurde eingengt

- 18 -

und in Methylenchlorid gelöst und 2x mit Natriumhydrogencarbonat-Lösung (1N) und 1x mit Natriumchlorid-Lösung (sat.) extrahiert. Die organische Phase wurde getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch nach den Stufengradientverfahren an  
5 Kieselgel 40-63  $\mu\text{m}$  mit dem Eluent Ethylacetat/n-Hexan + 1 % TEA (1:3 und 1:2) gereinigt. Man erhält das 4-Methoxy-4'-Nppoc-triphenylcarbinol als weißen festen Schaum.

Ausbeute: 5,5 g  $\approx$  75 % d. Th.

10

$R_f$ -Wert (Ethylacetat / n-Hexan 1:1 + 1 % TEA): 0,54

$^{13}\text{C}$ -NMR: (125.75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS):  $\delta$  = 17.70 (CH<sub>3</sub>-nppoc), 33.19 (CH-nppoc), 55.16 (CH<sub>3</sub>-O), 72.09 (CH<sub>2</sub>-nppoc), 81.31 (C-trityl), 113.23 (C-3,5-methoxyphenyl(trityl)), 120.04 (C-3,5-nppocphenyl(trityl)), 124.36  
15 (C-3-phenyl-nppoc), 126.83 (C-4-phenyl(trityl)), 127.71 (C-2,6-phenyl(trityl)), 127.91 (C-6-phenyl-nppoc), 128.28 (C-4-phenyl-nppoc), 129.03 (C-3,5-phenyl(trityl)), 129.11 (C-2,6-nppocphenyl(trityl)), 129.35 (C-2,6-methoxyphenyl(trityl)), 132.76 (C-5-phenyl-nppoc), 136.63 (C-1-phenyl-nppoc), 138.88 (C-1-methoxyphenyl(trityl)), 144.87 (C-1-nppocphenyl(trityl)), 146.75 (C-1-phenyl(trityl)), 149.93 (C-2-phenyl-nppoc), 150.18 (O(CO)O), 153.35 (C-4-nppocphenyl(trityl)), 158.71 ppm (C-4-methoxyphenyl(trityl)).

20

25

### 1.9 4,4'-Dimethoxy-4''-(2-[2-nitrophenyl]-propyloxycarbonyloxy)-triphenylcarbinol (S3)

30

Zu 4,00 g (7,23 mmol, 1 eq) 4,4'-Dimethoxy-4''-tert.Butoxydiphenylsilyloxytriphenylcarbinol gelöst in 20 ml THF wurden 8,00 ml (8,00 mmol, 1,1 eq) 1M-TBAF-Lösung getropft und 1 h bei RT nachgerührt. Um die Reaktion abubrechen wurden 10 ml Pyridin/MeOH/Wasser (3:1:1) und  
Pyridinium-Dowex zugegeben. Nach 30 min wurde abfiltriert mit Pyridin gespült und eingeeengt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch nach dem Stufengradientverfahren über Kieselgel 40-63  $\mu\text{m}$ , Eluent

- 19 -

Ethylacetat/n-Hexan + 1 % TEA (1:3 und 1:1), gereinigt. Zu 0,40 g (1,25 mmol) des gewonnenen 4,4'-Dimethoxy-4''-hydroxytriphenylcarbinols, gelöst in 30 ml Pyridin/Methylenchlorid (2:1), wurden 0,40 g (1,70 mmol, 1,4 eq) Nppoc-Cl, gelöst in 5 ml Methylenchlorid, zugetropft. Der Ansatz wurde 16 h bei RT gerührt. Danach wurde eingeeengt, in Methylenchlorid gelöst und 2x mit Natriumhydrogencarbonat-Lösung (1N) und 1x mit Natriumchlorid-Lösung (sat.) extrahiert. Die organische Phase wurde getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel 40-63  $\mu$ m mit dem Eluent Ethylacetat/n-Hexan + 1 % TEA (1:3) gereinigt. Man erhält das 4,4'-Dimethoxy-4''-Nppoc-triphenylcarbinol als weißen festen Schaum.

Ausbeute: 0,57 g  $\approx$  86 % d. Th.

R<sub>f</sub>-Wert (Ethylacetat / n-Hexan 1:1 + 1 % TEA): 0,59

#### 1.10 4,4'-Di-(2-[2-nitrophenyl]-propyloxycarbonyloxy)-triphenylcarbinol (S4)

Zu 2,00 g (2,40 mmol, 1 eq) 4,4'-Di-tert.Butoxydiphenylsilyloxy-triphenylcarbinol, gelöst in 30 ml THF, wurden 5,28 ml (5,28 mmol, 2,2 eq) 1M-TBAF-Lösung zugetropft und 1 h bei RT gerührt. Um die Reaktion abubrechen wurden 20 ml Pyridin/MeOH/Wasser (3:1:1) und Pyridinium-Dowex zugegeben. Nach 30 min wurde abfiltriert und mit Pyridin gespült. Anschließend wurde die Lösung mehrmals mit Pyridin coevaporiert. Zu dem in 60 ml Pyridin/Methylenchlorid (2:1) gelösten Ansatz wurde 2,19 g (9,00 mmol, 3,7 eq) Nppoc-Cl, gelöst in 10 ml Methylenchlorid, zugetropft und 16 h bei RT gerührt. Danach wurde eingeeengt, in Methylenchlorid gelöst und 2x mit Natriumhydrogencarbonat-Lösung (1N) und 1x mit Natriumchlorid-Lösung (sat.) extrahiert. Die organische Phase wurde getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel 40-63  $\mu$ m mit dem Eluent

- 20 -

Ethylacetat/n-Hexan + 1 % TEA (1:1) gereinigt. Man erhält das 4,4'-Di-Nppoc-triphenylcarbinol als weißen festen Schaum.

Ausbeute: 0,75g  $\approx$  40,9 % d. Th.

5

R<sub>f</sub>-Wert (Ethylacetat / n-Hexan 1:1 + 1 % TEA): 0,55

**1.11 4-Methoxy-4',4''-di-(2-[2-nitrophenyl]-propyloxycarbonyloxy)-triphenylcarbinol (S5)**

10 Zu 7,85 g (9,44 mmol, 1 eq) 4-Methoxy-4',4''-di-tert.butoxydiphenylsilyloxytriphenylcarbinol, gelöst in 50 ml THF, wurden 20,77 ml (20,77 mmol, 2,2 eq) 1M-TBAF-Lösung zugetropft und 1 h bei RT gerührt. Um die Reaktion abubrechen wurden 20 ml Pyridin/MeOH/Wasser (3:1:1) und Pyridinium-Dowex zugegeben. Nach 30 min wurde abfiltriert und mit  
15 Pyridin gespült. Anschließend wurde die Lösung mehrmals mit Pyridin coevaporiert. Zu dem in 60 ml Pyridin/Methylenchlorid (2:1) gelösten Ansatz wurden 6,10 g (25,03 mmol 2,6 eq) Nppoc-Cl, gelöst in 10 ml Methylenchlorid, zugetropft und 16 h bei RT gerührt. Danach wurde eingeeengt, in Methylenchlorid gelöst und 2x mit Natriumhydrogencarbonat-Lösung (1N) und 1x mit Natriumchlorid-Lösung (sat.) extrahiert. Die  
20 organische Phase wurde getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch nach dem Stufengradientenverfahren an Kieselgel 40-63  $\mu$ m mit dem Eluent Ethylacetat/n-Hexan + 1 % TEA (1:2, 2:3 bis 1:1) gereinigt. Man erhält das 4-Methoxy-4',4''-di-Nppoc-triphenylcarbinol als weißen festen Schaum.  
25

Ausbeute: 3,0 g  $\approx$  43 % d. Th.

R<sub>f</sub>-Wert (Ethylacetat / n-Hexan 1:1 + 1 % TEA): 0,65

30

**1.12 4,4',4''-Tri-(2-[2-nitrophenyl]-propyloxycarbonyloxy)-triphenylcarbinol (S6)**

Zu 10,20 g (9,53 mmol, 1 eq) 4,4',4''-Tri-tert.Butoxydiphenylsilyloxy-triphenylcarbinol, gelöst in 200 ml THF, wurden 31,45 ml (31,45 mmol, 3,3 eq) 1M-TBAF-Lösung zugetropft und 1 h bei RT gerührt. Um die Reaktion abubrechen wurden 20 ml Pyridin/MeOH/Wasser (3:1:1) und Pyridinium-Dowex zugegeben. Nach 30 min wurde abfiltriert und mit Pyridin gespült. Anschließend wurde die Lösung mehrmals mit Pyridin coevaporiert. Zu dem in 120 ml Pyridin/Methylenchlorid (2:1) gelösten Ansatz wurde 9,29 g (38,12 mmol, 4,0 eq) Nppoc-Cl, gelöst in 20 ml Methylenchlorid, zugetropft und 16 h bei RT gerührt. Danach wurde eingeeengt, in Methylenchlorid gelöst und 2x mit Natriumhydrogencarbonat-Lösung (1N) und 1x mit Natriumchlorid-Lösung (sat.) extrahiert. Die organische Phase wurde getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch nach dem Stufengradientenverfahren an Kieselgel 40-63  $\mu$ m mit dem Eluent Ethylacetat/n-Hexan + 1 % TEA (1:2, bis 1:1) gereinigt. Man erhält das 4,4',4''-Tri-Nppoc-triphenylcarbinol als weißen festen Schaum.

Ausbeute: 3,9 g  $\approx$  44 % d. Th.

R<sub>f</sub>-Wert (Ethylacetat / n-Hexan 1:1 + 1 % TEA): 0,49

<sup>13</sup>C-NMR: (125.75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS):  $\delta$  = 17.68 (CH<sub>3</sub>-nppoc), 33.17 (CH-nppoc), 72.14 (CH<sub>2</sub>-nppoc), 80.89 (C-trityl), 120.31 (C-3,3', 3'',5,5',5''-trityl), 124.35 (C-3-phenyl-nppoc), 127.83 (C-6-phenyl-nppoc), 128.27 (C-4-phenyl-nppoc), 128.99 (C-2,2',2'',6,6',6''-trityl), 132.77 (C-5-phenyl-nppoc), 136.62 (C-1-phenyl-nppoc), 144.09 (C-1,1', 1''-trityl), 150.14 (O(CO)O), 150.17 (C-2-phenyl-nppoc), 153.36 ppm (C-4,4',4''-trityl).

MS (TOF, ES<sup>+</sup>): 952,29 [M + Na], 968,25 [M + K].

MS (TOF, ES<sup>-</sup>): 928,42 [M-H], 694,37 [M-Cl].

C<sub>49</sub>H<sub>43</sub>N<sub>3</sub>O<sub>16</sub>: 929,90

### 1.13 Halogenierung und Veretherung zu den 5'-O-Nppoc-triphenyl-methyl-Thymidin Derivaten

1 eq des Triphenylcarbinol-Derivates wurden mit 100 eq Thionylchlorid für 3 h bei 90 °C erhitzt. Anschließend wurde Methylenchlorid zugegeben und weitere 2 h erhitzt. Danach wurde mit Cyclohexan 3x eingeeengt. Das entstandene Triphenylmethylchlorid-Derivat wurde in Methylenchlorid gelöst und unter Schutzgas 2 eq Thymidin, gelöst in Pyridin und Methylenchlorid, zugetropft. Nach 16 h Rühren bei RT wurde die Reaktion durch Zugabe von Ethanol abgebrochen. Danach wurde eingeeengt, in Methylenchlorid gelöst und 2x mit Natriumhydrogencarbonat-Lösung (1N) und 1x mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung extrahiert. Die organische Phase wurde getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt an Kieselgel 40-63 µm. Laufmittel und Ausbeuten sind der folgenden Tabelle 1 zu entnehmen:

Tabelle 1:

Substanz	Kochzeit SOCl <sub>2</sub>	R <sub>f</sub> -Wert: Eluent + 1 % TEA	Ausbeute
5'-O-(4-Nppoc-trityl)-thymidin	2 + 3 h	(CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> + 5 % MeOH) 0,26	95 %
5'-O-(4-Methoxy-4'-Nppoc-trityl)-thymidin	3 + 2 h	(EE/Hex 2:1) 0,18	50 %
5'-O-(4,4'-Dimethoxy-4''Nppoc-trityl)-thymidin	2 + 3 h	(CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> + 5 % MeOH) 0,30	83 %
5'-O-(4,4'-DiNppoc-trityl)-thymidin	4 + 1 h	(EE/Hex 3:1) 0,34	26 %
5'-O-(4-Methoxy-4',4''-diNppoc-trityl)-thymidin	4 + 1 h	(EE/Hex 2:1) 0,21	44 %



- 23 -

5'-O-(4,4'-TriNppoc-trityl)-thymidin	4 + 1 h	(EE/Hex 3:1) 0,25	13 %
--------------------------------------	---------	----------------------	------

Man erhält das 5'-Triphenylmethyl-Thymidin Derivate als weißen festen  
 5 Schaum in Ausbeuten zwischen 13-95 % d. Th.

NMR-Daten zu 5'-O-(4-Methoxy-4'-(2-[2-nitrophenyl]-propyloxycarbonyloxy)-trityl)-thymidin

<sup>13</sup>C-NMR: (125.75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS):  $\delta$  = 11.78 (5-CH<sub>3</sub>), 17.60 (CH<sub>3</sub>-  
 10 nppoc), 33.10 (CH-nppoc), 40.72 (C-2'), 55.15 (O-CH<sub>3</sub>), 63.67 (C-5'),  
 70.95 (C-3'), 72.11 (CH<sub>2</sub>-nppoc), 84.65 (C-4'), 85.03 (C-1'), 86.64  
 (C-trityl), 111.20 (C-5), 113.25 (C-3,5-methoxyphenyl(trityl)), 120.35  
 (C-3,5-nppocphenyl(trityl)), 124.27 (C-3-phenyl-nppoc), 127.27  
 (C-4-phenyl(trityl)), 127.69 (C-6-phenyl-nppoc), 127.79 (C-2,6-phenyl  
 15 (trityl)), 128.19 (C-4-phenyl-nppoc), 128.98 (C-4-phenyl-nppoc), 129.07  
 (C-2,6-nppocphenyl(trityl)), 134.35 (C-1-methoxyphenyl(trityl)), 135.54  
 (C-6), 136.52 (C-1-phenyl-nppoc), 141.60 (C-1-nppocphenyl(trityl)),  
 144.91 (C-1-phenyl(trityl)), 149.80 (C-2-phenyl-nppoc), 150.08 (O(CO)O),  
 150.61 (C-2), 153.31 (C-4-nppocphenyl(trityl)), 158.74 (C-4-  
 20 methoxyphenyl(trityl)), 164.17 ppm (C-4).

#### 1.14 4-Methoxy-4'-(2-[2-nitrophenyl]-propyloxycarbonyloxy)-triphenyl-carbinol (S2)

Zur schutzgruppenfreie Synthese wurden in einem ausgeheizten Kolben  
 25 0,50 g (20,60 mmol, 1,2 eq) Magnesium mit 20 ml THF unter Argon  
 suspendiert. 3,2 ml (25,70 mmol, 1,5 eq) Bromanisol wurden mit einem  
 Tropftrichter langsam unter konstantem Sieden zugetropft. Nach  
 Beendigung der Zugabe wurde mit einem Ölbad auf 85 °C erhitzt und 15  
 Minuten lang gerührt. Das entstandene Magnesiumbromid wurde auf 70 °C  
 30 abkühlen gelassen und 3,40 g (17,17 mmol, 1 eq) 4-Hydroxybenzophenon,  
 gelöst in 50 ml THF, zugetropft und für weitere 2 h bei 70 °C gerührt.  
 Anschließend wurde der Ansatz erkalten gelassen und mit gesättigter

- 24 -

Amoniumchlorid- Lösung die Reaktion abgebrochen. Zum Extrahieren wurden 250 ml Ethylacetat zugegeben und 2x mit Amoniumchlorid-Lösung (sat.) und 1x mit Natriumchlorid-Lösung (sat.) extrahiert. Die organische Phase wurde mit Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Auf eine Aufarbeitung wurde verzichtet und mit Pyridin mehrfach coevaporiert.

Zu dem in 40 ml Pyridin/Methylenchlorid (1:1) gelösten Ansatz wurden 11,00 g (45,00 mmol) Nppoc-Cl gelöst, in 15ml Methylenchlorid, zugetropft und 16 h bei RT gerührt. Danach wurde eingeeengt, in Methylenchlorid gelöst, 2x mit Natriumhydrogencarbonat-Lösung (1N) und 1x mit Natriumchlorid-Lösung (sat.) extrahiert. Die organische Phase wurde getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch nach dem Stufengradientenverfahren an Kieselgel 40-63  $\mu$ m, Eluent Ethylacetat/n-Hexan + 1 % TEA (1:3 und 1:2), gereinigt. Man erhält das 4-Methoxy-4'-Nppoc-triphenylcarbinol als weißen festen Schaum.

Ausbeute: 3,7 g  $\approx$  42 % d. Th.

R<sub>f</sub>-Wert (Ethylacetat / n-Hexan 1:1 + 1 % TEA): 0,54

#### 1.15 5'-O-(4,4',4''-Tri-pivaloyl-triphenylmethyl)-Thymidin aus Rosolsäure

Zu 5 g (17,22 mmol) p-Rosolsäure, gelöst in 75 ml Pyridin und 2,5 ml 2,6-Lutidin, wurden 10 ml (9,8 mmol, 4,7 eq) Pivaloylsäurechlorid zugetropft. Anschließend wurde bei 70 °C für 80 min gerührt. Beim Erkalten lassen bildeten sich Kristalle, die isoliert und mit Pyridin gespült wurden. 1 g (1,73 mmol) der Kristalle wurden in 25 ml Methylenchlorid gelöst, unter DMAP-Katalyse (20 mg, 0,17 mmol), mit 20 ml 2,6-Lutidin und 220 mg (0,86 mmol) Thymidin umgesetzt. Danach wurde eingeeengt, in Methylenchlorid gelöst und 2x mit Natriumhydrogencarbonat-Lösung (1N) und 1x mit Natriumchlorid-Lösung (sat.) extrahiert. Die organische

- 25 -

Phase wurde getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch nach dem Stufengradientenverfahren an Kieselgel 40-63  $\mu\text{m}$ , Eluent Ethylacetat/n-Hexan + 1 % TEA (1:3, 1:2), gereinigt. Man erhält das 5'-O-(4,4',4''-Tri-pivaloyl-triphenylmethyl)-Thymidin als

5 weißen festen Schaum.

Ausbeute: 0,18 g  $\approx$  13,15 % d. Th.

$^{13}\text{C}$ -NMR: (125.75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS):  $\delta$  = 12.11 (5-CH<sub>3</sub>), 27.02 (CH<sub>3</sub>-piv), 38.93 (C-piv), 41.02 (C-2'), 63.92 (C-5'), 70.33 (C-3'), 84.53 (C-4'), 85.92 (C-1'), 86.20 (C-trityl), 110.82 (C-5), 120.97 (C-3,3',3'', 5,5',5''-trityl), 129.59 (C-2,2',2'',6,6',6''-trityl), 135.09 (C-6), 140.47 (C-1,1',1''-trityl), 151.00 (C-2), 154.21 (C-4,4',4''-trityl), 164.10 (C-4), 176.78 ppm (C=O-piv).

15

**1.16 5'-O-(4,4',4''-Tri-(2-[2-nitrophenyl]-propyloxycarbonyloxy)-triphenylmethyl)-deoxythymidin aus Rosolsäure**

10 g (34,44 mmol) p-Rosolsäure, gelöst in 120 ml Pyridin und 30 ml 2,6-Lutidin, wurde auf 50 °C erwärmt und 44 g (178,28 mmol) Nppoc-Cl

20 zugetropft. Nach 16 h Reaktionszeit bei 50 °C wurde überschüssiges Chlorid durch Zugabe von t-Butanol gequenchet. Die Umsetzung wurde mittels DC überprüft ( $R_f$ -Wert (Ethylacetat / n-Hexan 1:1 + 1 % TEA): 0,35). Nach weiteren 30 min Reaktionszeit wurden bei einer Temperatur von 45 °C 8,2 g Thymidin und 750 mg DMAP zugegeben. Nach 16 h Rühren wurde

25 eingeengt, in Methylchlorid gelöst, 2x mit Natriumhydrogencarbonat-Lösung (1N) und 1x mit Natriumchlorid-Lösung (sat.) extrahiert. Die organische Phase wurde getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel 40-63  $\mu\text{m}$ , Eluent Ethylacetat/n-Hexan + 1 % TEA (3:1), gereinigt. Man erhält das

30 5'-O-(4,4',4''-Tri-(2-[2-nitrophenyl]-propyloxycarbonyloxy)-triphenylmethyl)-deoxythymidin als weißen festen Schaum.

- 26 -

Ausbeute: 10 g  $\approx$  25 % d. Th.

$R_f$ -Wert (Ethylacetat / n-Hexan 3:1 + 1 % TEA): 0,25

$^{13}\text{C}$ -NMR: (125.75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS):  $\delta$  = 12.00 (5-CH<sub>3</sub>), 17.59 (CH<sub>3</sub>-nppoc), 33.06 (CH-nppoc), 40.50 (C-2'), 63.74 (C-5'), 71.48 (C-3'), 72.14 (CH<sub>2</sub>-nppoc), 84.55 (C-4'), 85.52 (C-1'), 86.16 (C-trityl), 111.13 (C-5), 120.58 (C-3,3',3'',5,5',5''-trityl), 124.26 (C-3-phenyl-nppoc), 127.63 (C-6-phenyl-nppoc), 128.19 (C-4-phenyl-nppoc), 129.58 (C-2,2',2'',6,6',6''-trityl), 135.29 (C-6), 136.47 (C-1-phenyl-nppoc), 140.53 (C-1,1',1''-trityl), 150.09 (C-2-phenyl-nppoc), 150.34 (O(CO)O), 150.34 (C-2), 153.13 (C-4,4',4''-trityl), 163.73 ppm (C-4).

MS (TOF, ES<sup>+</sup>): 1175,89 [M + Na], 1191,83 [M + K].

MS (TOF, ES<sup>-</sup>): 1152,87 [M-H].

$\text{C}_{59}\text{H}_{55}\text{N}_5\text{O}_{20}$ : 1154,12

**1.17 5'-O-(4,4',4''-Tri-(2-[2-nitrophenyl]-propyloxycarbonyloxy)-triphenylmethyl)-N<sup>4</sup>-isobutryl-deoxycytidin**

2,8 g (9,64 mmol) p-Rosolsäure, gelöst in 20 ml Pyridin und 20 ml 2,6-Lutidin, wurden auf 50 °C erwärmt und 14,0 g (56,72 mmol) Nppoc-Cl zugetropft. Nach 30 min wurde überschüssiges Chlorid durch Zugabe von t-Butanol gequencht. Die Umsetzung wurde mittels DC überprüft ( $R_f$ -Wert (Methylenchlorid/Methanol 5 % + 1 % TEA): 0,36). Nach weiteren 30 min Reaktionszeit bei einer Temperatur von 45 °C wurden 3,80 g N<sup>4</sup>-Isobutryl-deoxycytidin und 250 mg DMAP, gelöst in 30ml DMF, zugegeben. Nach 36 h wurde eingeeengt, in Methylenchlorid gelöst und 2x mit Natriumhydrogencarbonat-Lösung (1N) und 1x mit Natriumchlorid-Lösung (sat.) extrahiert. Die organische Phase wurde getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel 40-63  $\mu\text{m}$ , Eluent Ethylacetat/n-Hexan + 1 % TEA (3:1), gereinigt. Man erhält das 5'-O-(4,4',4''-Tri-(2-[2-nitrophenyl]-propyloxycarbonyloxy)-triphenylmethyl)-N<sup>4</sup>-isobutryl-deoxycytidin als weißen festen Schaum.

- 27 -

Ausbeute: 2,6 g  $\approx$  16,8 % d. Th.

$R_f$ -Wert (Ethylacetat / n-Hexan 3:1 + 1 % TEA): 0,25

$^{13}\text{C}$ -NMR: (125.75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS):  $\delta$  = 17.61 (CH<sub>3</sub>-nppoc), 18.89 (CH<sub>3</sub>-ibu), 33.10 (CH-nppoc), 36.10 (CH-ibu), 41.69 (C-2'), 63.39 (C-5'), 70.67 (C-3'), 72.10 (CH<sub>2</sub>-nppoc), 85.90 (C-4'), 86.18 (C-trityl), 87.06 (C-1'), 96.45 (C-5), 120.60 (C-3,3',3'', 5,5',5''-trityl), 124.27 (C-3-phenyl-nppoc), 127.62 (C-6-phenyl-nppoc), 128.21 (C-4-phenyl-nppoc), 129.55 (C-2,2',2'',6,6',6''-trityl), 132.72 (C-5-phenyl-nppoc), 136.50 (C-1-phenyl-nppoc), 140.50 (C-1,1',1''-trityl), 143.85 (C-6), 150.08 (O(CO)O), 150.08 (C-2-phenyl-nppoc), 153.15 (C-4,4',4''-trityl), 155.32 (C-2), 162.32 (C-4), 176.91 ppm (C=O-ibu).

MS (TOF, ES<sup>+</sup>): 1209,48 [M + H], 1231,48 [M + Na].

MS (TOF, ES): 1209,48 [M-H].

$\text{C}_{62}\text{H}_{60}\text{N}_6\text{H}_{20}$ : 1209,20

### 1.18 5'-O-(4,4',4''-Tri-(2-[2-nitrophenyl]-propyloxycarbonyloxy)-triphenylmethyl)-N<sup>6</sup>-pivaloyl-deoxyadenosin

2,8 g (9,64 mmol) p-Rosolsäure, gelöst in 20 ml Pyridin und 20 ml 2,6-Lutidin, wurden auf 50 °C erwärmt und 14,0 g (56,72 mmol) Nppoc-Cl zugetropft. Nach 30 min wurde überschüssiges Chlorid durch Zugabe von t-Butanol gequenchet. Die Umsetzung wurde mittels DC überprüft ( $R_f$ -Wert (Methylenchlorid/Methanol 5 % + 1 % TEA): 0,36). Nach weiteren 30 min Reaktionszeit bei einer Temperatur von 45 °C wurden 5,7 g N<sup>6</sup>-Pivaloyl-deoxyadenosin und 250 mg DMAP, gelöst in 30 ml DMF, zugegeben. Nach 36 h wurde eingeeengt, in Methylenchlorid gelöst und 2x mit Natriumhydrogencarbonat-Lösung (1N) und 1x mit Natriumchlorid-Lösung (sat.) extrahiert. Die organische Phase wurde getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel 40-63  $\mu\text{m}$ , Eluent Ethylacetat/n-Hexan + 1 % TEA (3:1), gereinigt. Man erhält das 5'-O-(4,4',4''-Tri-(2-[2-nitrophenyl]-propyloxycarbonyloxy)-triphenylmethyl)-N<sup>6</sup>-pivaloyl-deoxyadenosin als weißen festen Schaum.

- 28 -

Ausbeute: 1,3 g  $\approx$  6,8 % d. Th.

$^{13}\text{C}$ -NMR: (125.75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS):  $\delta$  = 17.56 (CH<sub>3</sub>-nppoc), 27.40 (CH<sub>3</sub>-piv), 33.04 (CH-nppoc), 39.69 (C-2'), 40.32 (C-piv), 63.73 (C-5'),  
 5 71.48 (C-3'), 72.35 (CH<sub>2</sub>-nppoc), 84.45 (C-4'), 85.82 (C-trityl), 85.90 (C-1'), 120.39 (C-3,3',3'',5,5',5''-trityl), 122.61 (C-5), 124.21 (C-3-phenyl-nppoc), 127.58 (C-6-phenyl-nppoc), 128.17 (C-4-phenyl-nppoc), 129.51 (C-2,2',2'',6,6',6''-trityl), 132.59 (C-5-phenyl-nppoc), 136.67 (C-1-phenyl-nppoc), 140.68 (C-1,1',1''-trityl), 141.32 (C-8), 149.90  
 10 (C-4), 149.93 (C-2-phenyl-nppoc), 150.03 (O(CO)O), 151.02 (C-6), 152.30 (C-2), 153.10 (C-4,4',4''-trityl), 175.67 ppm (C=O-piv).

MS (TOF, ES<sup>+</sup>): 1247,49 [M + H], 1270,48 [M + Na].

MS (TOF, ES<sup>-</sup>): 1245,46 [M-H].

$\text{C}_{64}\text{H}_{63}\text{N}_8\text{O}_{19}$ : 1247,25

15

**1.19 5'-O-(4,4',4''-Tri-(2-[2-nitrophenyl]-propyloxycarbonyloxy)-triphenylmethyl)-N<sup>2</sup>-isobutryl-deoxyguanosin**

4,0 g (13,8 mmol) p-Rosolsäure, gelöst in 50 ml Pyridin und 30 ml 2,6-Lutidin, wurden auf 50 °C erwärmt und 18,0 g (73,9 mmol) Nppoc-Cl  
 20 zugetropft. Nach 16 h wurde überschüssiges Chlorid durch Zugabe von t-Butanol gequenchet. Die Umsetzung wurde mittels DC überprüft ( $R_f$ -Wert (Ethylacetat / n-Hexan 1:1 + 1 % TEA): 0,36). Nach weiteren 30 min Reaktionszeit bei einer Temperatur von 40 °C wurden 4,60 g N<sup>2</sup>-Isobutryl-deoxyguanosin und 250 mg DMAP, gelöst in 30 ml DMF, zugegeben. Nach 36 h wurde  
 25 eingeeengt, in Methylenchlorid gelöst und 2x mit Natriumhydrogencarbonat-Lösung (1N) und 1x mit Natriumchlorid-Lösung (sat.) extrahiert. Die organische Phase wurde getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel 40-63  $\mu\text{m}$ , Eluent Ethylacetat/n-Hexan + 1 % TEA (3:1), gereinigt. Man erhält das  
 30 5'-O-(4,4',4''-Tri-(2-[2-nitrophenyl]-propyloxycarbonyloxy)-triphenylmethyl)-N<sup>2</sup>-isobutryl-deoxyguanosin als weißen festen Schaum. (Methylenchlorid/Methanol 5% + 1% TEA): 0,22

- 29 -

Ausbeute: 1,3 g  $\approx$  7,0 % d. Th.

$^{13}\text{C}$ -NMR: (125.75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS):  $\delta$  = 17.63 (CH<sub>3</sub>-nppoc), 18.83 (CH<sub>3</sub>-ibu), 33.12 (CH-nppoc), 35.90 (CH-ibu), 39.89 (C-2'), 64.19 (C-5'),  
 5 70.97 (C-3'), 72.10 (CH<sub>2</sub>-nppoc), 83.90 (C-4'), 85.66 (C-trityl), 85.82 (C-1'), 120.31 (C-5), 120.34 (C-3,3',3'',5,5'',5-trityl), 124.21 (C-3-phenyl-nppoc), 127.61 (C-6-phenyl-nppoc), 128.25 (C-4-phenyl-nppoc), 129.57 (C-2,2',2'',6,6',6''-trityl), 132.78 (C-5-phenyl-nppoc), 136.47 (C-1-phenyl-nppoc), 137.74 (C-8), 140.82 (C-1,1',1''-trityl), 147.91  
 10 (C-4), 148.37 (C-2), 149.92 (C-2-phenyl-nppoc), 150.04 (O(CO)O), 153.19 (C-4,4',4''-trityl), 155.94 (C-6), 179.84 ppm (C=O-ibu).

$\text{C}_{63}\text{H}_{60}\text{N}_8\text{O}_{20}$ : 1249,22

**1.20 5'-O-(4,4',4''-Tri-(2-[2-nitrophenyl]-propyloxycarbonyloxy)-triphenylmethyl)-N<sup>6</sup>-pivaloyl-deoxyadenosin- $\beta$ -cyanoethyl-N,N-diisopropylaminophosphoamidit**

1,0 g (0,80 mmol) des 5'-Triphenylmethyldeoxyadenosin-Derivates wurden in Methylenchlorid und 2,6 eq Ethyldiisopropylamin gelöst und unter Schutzgas auf 0 °C abgekühlt. Anschließend wurden 1,2 eq Chlorphosphin  
 20 zugetropft und 10 min bei 0 °C gerührt. Es wurde 1 h bei RT gerührt und mit Ethanol die Reaktion abgebrochen. Danach wurde eingeeengt und in Methylenchlorid gelöst und 2x mit Natriumhydrogencarbonat-Lösung (1N) und 1x mit Natriumchlorid-Lösung (sat.) extrahiert. Die organische Phase wurde getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wurde  
 25 säulenchromatographisch mit Methylenchlorid/Methanol 2 % an Kieselgel 40-63  $\mu\text{m}$  gereinigt. Man erhält das 5'-O-(4,4',4''-Tri-(2-[2-nitrophenyl]-propyloxycarbonyloxy)-triphenylmethyl)-N<sup>6</sup>-pivaloyl-deoxyadenosin- $\beta$ -cyanoethyl-N,N-diisopropylaminophosphoamidit als weißen festen Schaum.

30 Ausbeute: 0,7 g  $\approx$  60 % d. Th.

$^{31}\text{P}$ -NMR (202,45 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 149,37 ppm.

- 30 -

**1.21 5'-O-(4,4',4''-Tri-(2-[2-nitrophenyl]-propyloxycarbonyloxy)-triphenylmethyl)-thymidin- $\beta$ -cyanoethyl-N,N-diisopropylaminophosphoamidit**

2,0 g (1,73 mmol) des 5'-Triphenylmethylthymidin-Derivates wurden in  
5 Methylenchlorid und 2,6 eq Ethyldiisopropylamin gelöst und unter  
Schutzgas auf 0 °C abgekühlt. Anschließend wurden 1,2 eq Chlorphosphin  
zugetropft und 10 Minuten bei 0 °C gerührt. Es wurde 1 h bei RT gerührt  
und mit Ethanol die Reaktion abgebrochen. Danach wurde eingeeengt, in  
Methylenchlorid gelöst und 2x mit Natriumhydrogencarbonat-Lösung (1N)  
10 und 1x mit Natriumchlorid-Lösung (sat.) extrahiert. Die organische Phase  
wurde getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wurde  
säulenchromatographisch mit Essigsäureethylester/Hexan 1:1 an Kieselgel  
40-63  $\mu$ m gereinigt. Man erhält das 5'-O-(4,4',4''-Tri-(2-[2-nitrophenyl]-  
propyloxycarbonyloxy)-triphenylmethyl)-thymidin- $\beta$ -cyanoethyl-N,N-  
15 diisopropylaminophosphoamidit als weißen festen Schaum.

Ausbeute: 2,1 g  $\approx$  89 % d. Th.

$^{31}\text{P}$ -NMR (202,45 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 149,77 ppm.

20

**Beispiel 2: Abspaltung von Schutzgruppen**

Die Säurebeständigkeit der nicht aktivierten Schutzgruppen wurde mit 80  
%iger Essigsäure bzw. 1 %iger Trichloressigsäure (Standardbedingungen  
25 für die Oligonukleotidsynthese) durchgeführt. Tabelle 2 gibt das Ergebnis  
dieser Studie wieder.

Alle Proben werden zunächst für 300 s bzw. 900 s in 80 %iger Essigsäure  
gelöst und auf der HPLC analysiert. Diejenigen, die diese Behandlung ohne  
30 Etherspaltung überstehen, werden für 300 s bzw. 900 s mit 1 %iger  
Trichloressigsäure behandelt und anschließend analysiert.



Tabelle 2:

	Verbindung	Symbol	80 %ige Essigsäure	1 %ige Tri- chloroessigsäure
5	5'-O-(4-Nppoc-trityl)- thymidin	S1	stabil	labil
	5'-O-(4-Methoxy-4'-Nppoc- trityl)-thymidin	S2	stabil	labil
	5'-O-(4,4'-Dimethoxy-4''- Nppoc-trityl)-thymidin	S3	labil	labil
10	5'-O-(4,4'-DiNppoc-trityl)- thymidin	S4	stabil	labil
	5'-O-(4-Methoxy-4,4''- diNppoc-trityl)-thymidin	S5	stabil	labil
15	5'-O-(4,4',4''-TriNppoc- trityl)-thymidin	S6	stabil	stabil

Es zeigt sich, dass die 4,4',4''-TriNppoc-trityl-Schutzgruppe (S6) in Trichloroessigsäure stabil ist.

### 20 Beispiel 3: Optimierung der Synthese

Eine erste Optimierung wird durch Verwendung von Diphenylmethylchlorsilan anstelle von tert.Butoxydiphenylchlorsilan erzielt.

### 25 Beispiel 4: 2 Experimente an der festen Phase

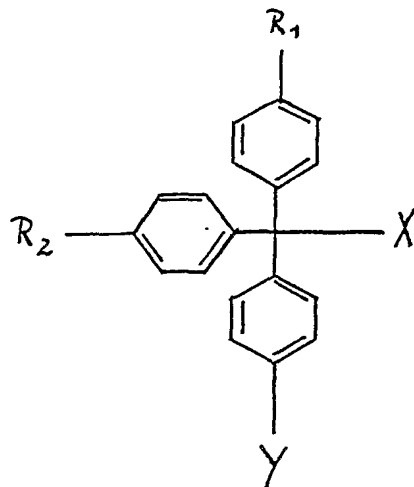
- 32 -

Die zweistufigen Schutzgruppen werden auf einer festen Phase getestet. Der prinzipielle Funktionalitätstest wird auf einem DNA-Prozessor D durchgeführt in einem Geniom® one-Gerät durchgeführt.

- 5     An eine silanisierte DNA-Prozessoroberfläche wird 5'-O-(4,4',4''-TriNppoc-trityl)-thymidin-phosphoamidit ankondensiert. Es erfolgt eine punktuelle Belichtung, eine anschließende Säurebehandlung (max. 2 min) und die Kopplung eines Spacers. Abschließend erfolgt nochmals eine Detektion.
- 10    Als Kontrolle erfolgt das analoge Experiment. Es wird jedoch statt des Amidits mit der Tandem-Schutzgruppe ein NPPOC-dT-Amidit gekoppelt. Durch dieses Experiment konnte die Funktionalität der zweistufigen Schutzgruppe gezeigt werden.

### Ansprüche

1. Verfahren zur Synthese von Biopolymeren durch schrittweisen  
5 Aufbau aus Synthesebausteinen, die Schutzgruppen tragen,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
dass man mindestens einen Synthesebaustein verwendet, der eine  
zweistufige Schutzgruppe trägt, wobei die zweistufige Schutzgruppe  
durch einen Belichtungsschritt aktiviert und einen anschließenden  
10 chemischen Behandlungsschritt abgespalten wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
dass der chemische Behandlungsschritt eine Behandlung mit Base,  
15 eine Behandlung mit Säure, eine Oxidation, eine Reduktion oder/und  
eine enzymatische Reaktion umfasst.
3. Verfahren nach Anspruch 2,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
20 dass der chemische Behandlungsschritt eine Säurebehandlung  
umfasst.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
25 dass man als zweistufige Schutzgruppe eine derivatisierte  
Tritylgruppe verwendet.
5. Verfahren nach Anspruch 4,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
30 dass der Synthesebaustein mit der zweistufigen Schutzgruppe die  
allgemeine Formel I aufweist:



wobei  $R_1$  und  $R_2$  jeweils unabhängig ausgewählt sind aus Wasserstoff,  $OR_3$ ,  $O(CH_2)_nCOOR_3$  und  $NHZ$ ,

$R_3$  eine  $C_1$ - $C_8$  Alkylgruppe, eine  $C_2$ - $C_8$ -Alkenylgruppe, eine  $C_2$ - $C_8$ -Alkynylgruppe oder/und eine  $C_6$ - $C_{20}$  Arylgruppe enthält, die gegebenenfalls Substituenten aufweisen kann,

$X$  den Synthesebaustein darstellt,

$Y$  jeweils unabhängig eine fotoaktivierbare Schutzgruppe ist,

$Z$  eine Aminoschutzgruppe ist,

$n$  eine ganze Zahl von 0 bis 4 ist und

wobei gegebenenfalls  $R_1$  oder/und  $R_2$  durch  $Y$  ersetzt sein können.

6. Verfahren nach Anspruch 5,

**dadurch gekennzeichnet,**

dass man eine zweistufige Schutzgruppe verwendet, die mindestens eine fluoreszierende Gruppe trägt.

7. Verfahren nach Anspruch 6,

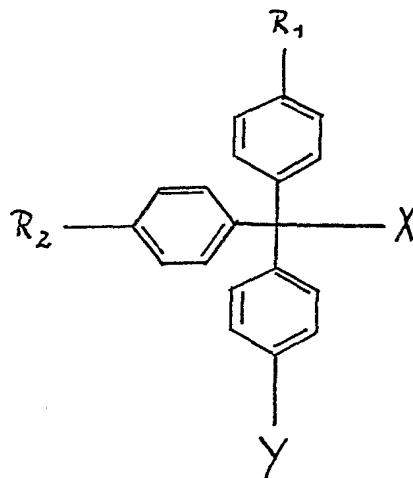
**dadurch gekennzeichnet,**

dass  $Y$ ,  $R_3$  oder/und  $Z$  die fluoreszierende Gruppe tragen.

- 35 -

8. Verfahren nach Anspruch 6 oder 7,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
dass die fluoreszierende Gruppe durch Substitution am Trityl-Gerüst  
eingeführt wird.
- 5 9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
dass die fotoaktivierbare Gruppe der zweistufigen Schutzgruppe  
ausgewählt wird aus Nitroveratryloxycarbonyl (NVOC),  $\alpha$ -Methyl-6-  
10 nitropiperonyloxycarbonyl (MeNPOC), 3,5-Dimethoxybenzoin-  
carbonat (DMBOC), 2-(o-Nitrophenyl)propyloxycarbonyl (NPPOC), o-  
Nitrobenzyl und Derivaten davon und 2-(o-Nitrophenyl)ethyl und  
Derivaten davon.
- 15 10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
dass die Biopolymere ausgewählt werden aus Nukleinsäuren,  
Nukleinsäureanaloga, Peptiden und Sacchariden.
- 20 11. Verfahren nach Anspruch 10,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
dass die Biopolymere ausgewählt werden aus Nukleinsäuren und  
Nukleinsäureanaloga.
- 25 12. Verfahren nach Anspruch 11,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
dass als Synthesebausteine Phosphoramidite verwendet werden.
- 30 13. Verfahren nach Anspruch 12,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
dass Phosphoramiditbausteine verwendet werden, die die  
zweistufige Schutzgruppe am 5'-O-Atom tragen.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 13,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
dass die Synthese der Biopolymeren die Verwendung von Spacer-  
bzw. Linkerbausteinen umfasst.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
dass die Synthese der Biopolymeren auf einer Festphase  
durchgeführt wird.
16. Verfahren nach Anspruch 15,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
dass eine ortsabhängige Synthese von mehreren Biopolymeren mit  
jeweils einer unterschiedlichen Sequenz von Synthesebausteinen auf  
einem einzigen Träger durchgeführt wird.
17. Verbindungen der allgemeinen Formel I



wobei  $R_1$  und  $R_2$  jeweils unabhängig ausgewählt sind aus  
Wasserstoff,  $OR_3$ ,  $O(CH_2)_nCOOR_3$  und  $NHZ$ ,

- 37 -

$R_3$  eine  $C_1$ - $C_8$  Alkylgruppe, eine  $C_2$ - $C_8$ -Alkenylgruppe, eine  $C_2$ - $C_8$ -Alkynylgruppe oder/und eine  $C_6$ - $C_{20}$  Arylgruppe enthält, die gegebenenfalls Substituenten aufweisen kann,

X einen Synthesebaustein zur Synthese von Biopolymeren oder eine Abgangsgruppe darstellt,

Y jeweils unabhängig eine fotoaktivierbare Schutzgruppe ist,

Z eine Aminoschutzgruppe ist,

n eine ganze Zahl von 0 bis 4 ist und

wobei gegebenenfalls  $R_1$  oder/und  $R_2$  durch Y ersetzt sein können.

18. Verbindungen nach Anspruch 17,

**dadurch gekennzeichnet,**

dass sie mindestens eine fluoreszierende Gruppe tragen.

19. Verbindungen nach Anspruch 18,

**dadurch gekennzeichnet,**

dass Y,  $R_3$  oder/und Z eine fluoreszierende Gruppe tragen.

20. Verbindungen nach Anspruch 18 oder 19,

**dadurch gekennzeichnet,**

dass eine fluoreszierende Gruppe durch Substitution am Trityl-Grundgerüst eingeführt ist.

21. Verwendung von Verbindungen der allgemeinen Formel I als Synthesebausteine bzw. zur Herstellung von Synthesebausteinen für die Synthese von Biopolymeren.

- 1/11 -

Abbildung 1

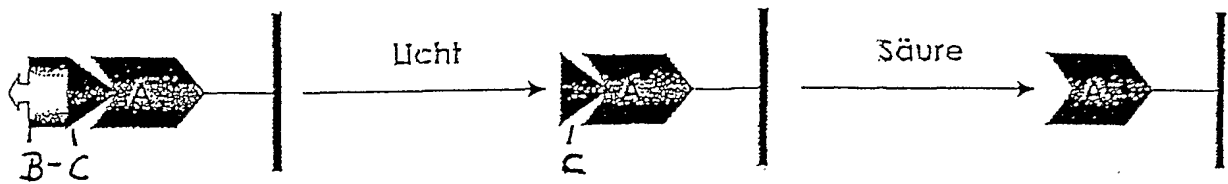
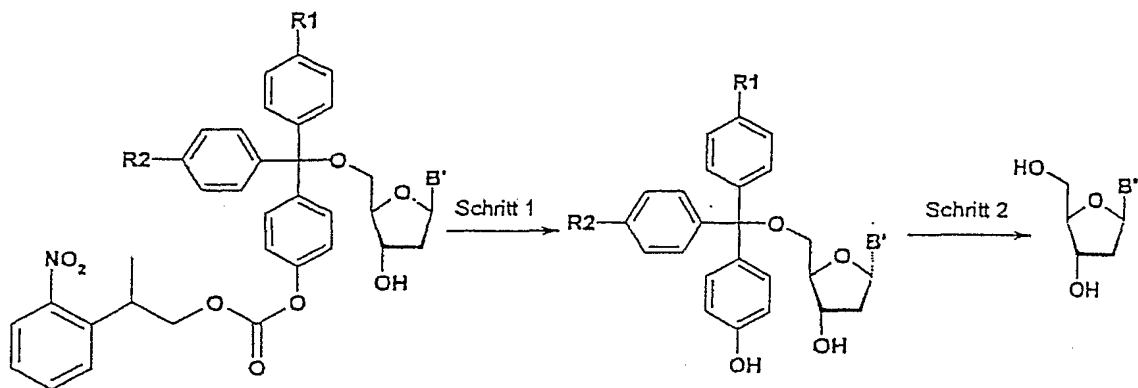
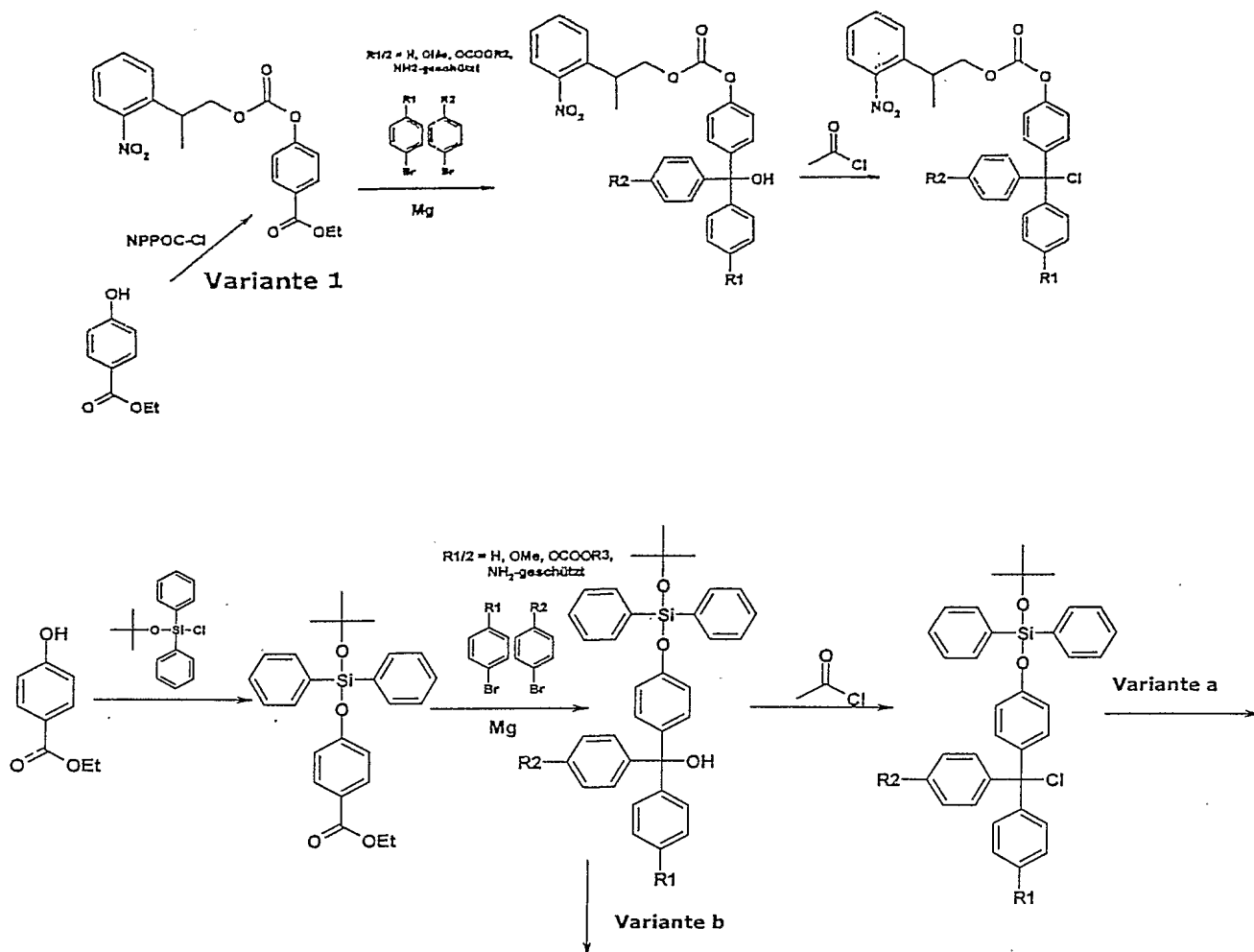


Abbildung 2



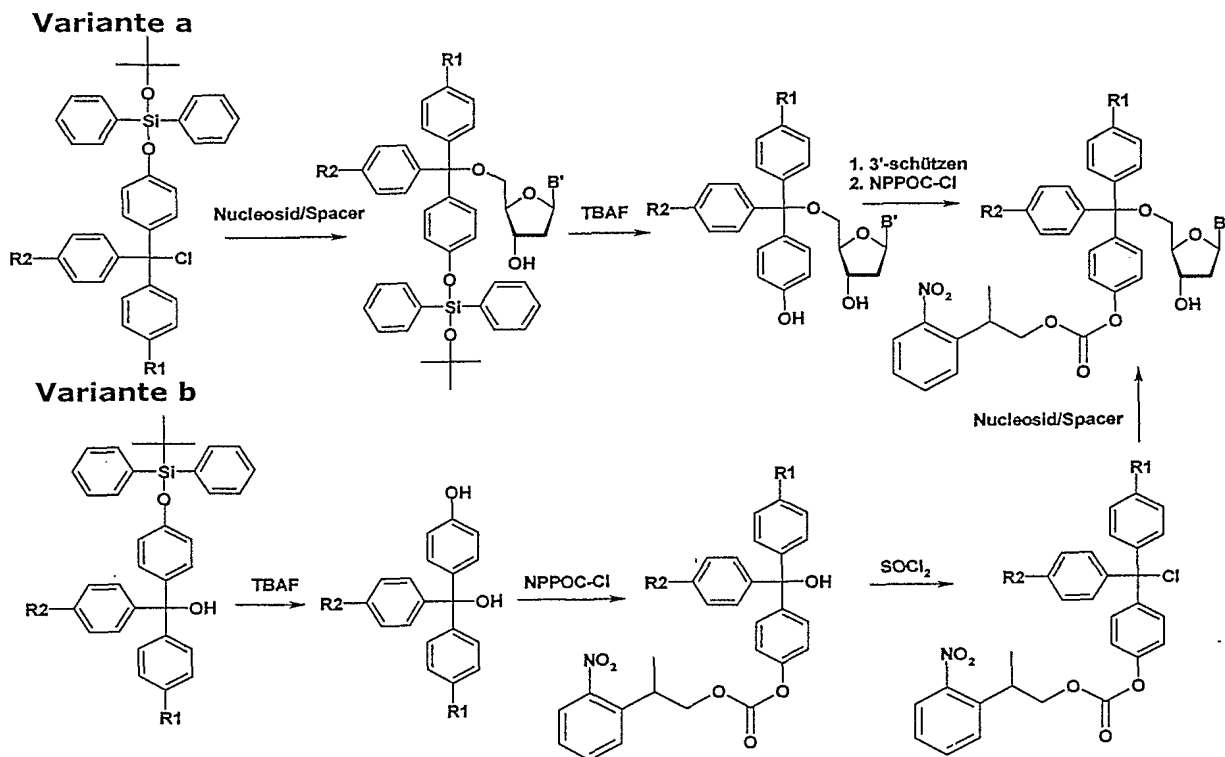


### Abbildung 3



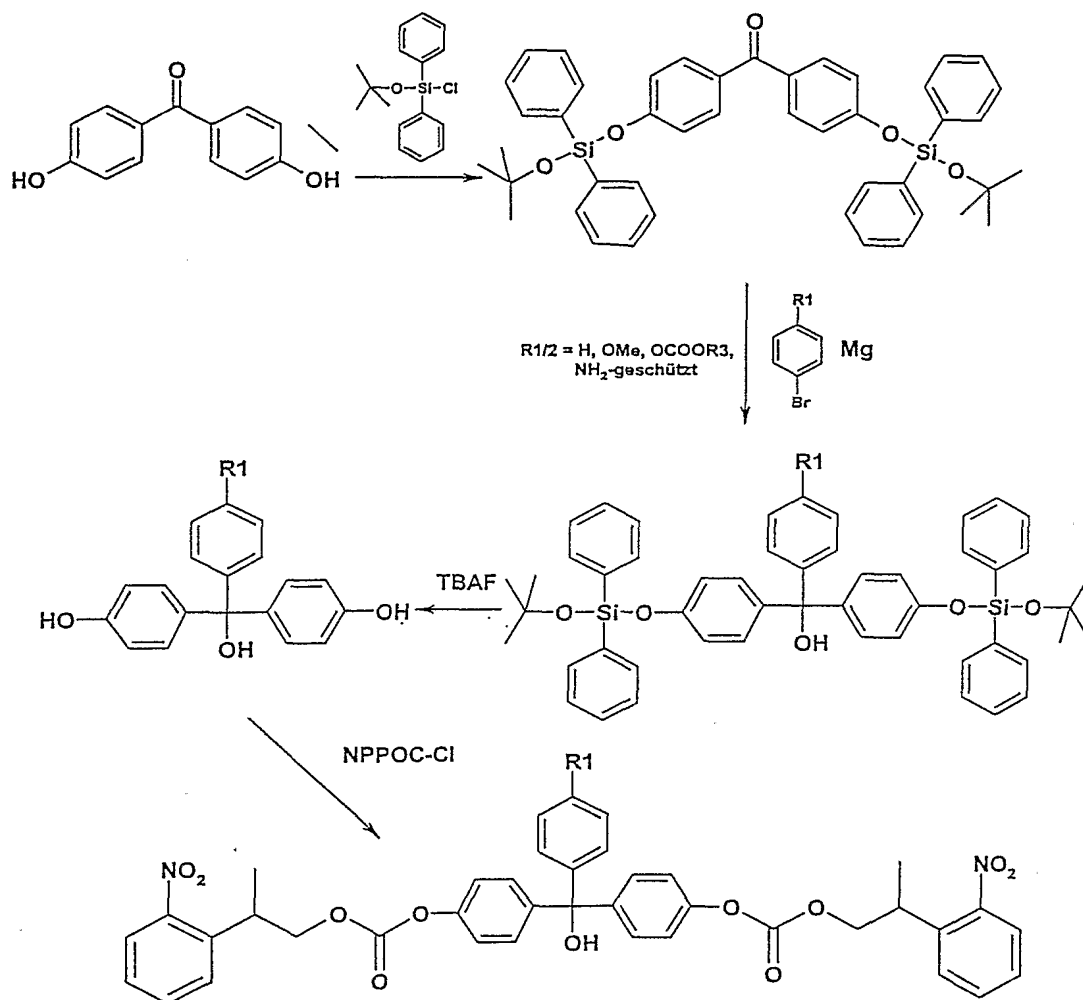
- 3/11 -

Abbildung 4



- 4/11 -

Abbildung 5



- 5/11 -

Abbildung 6

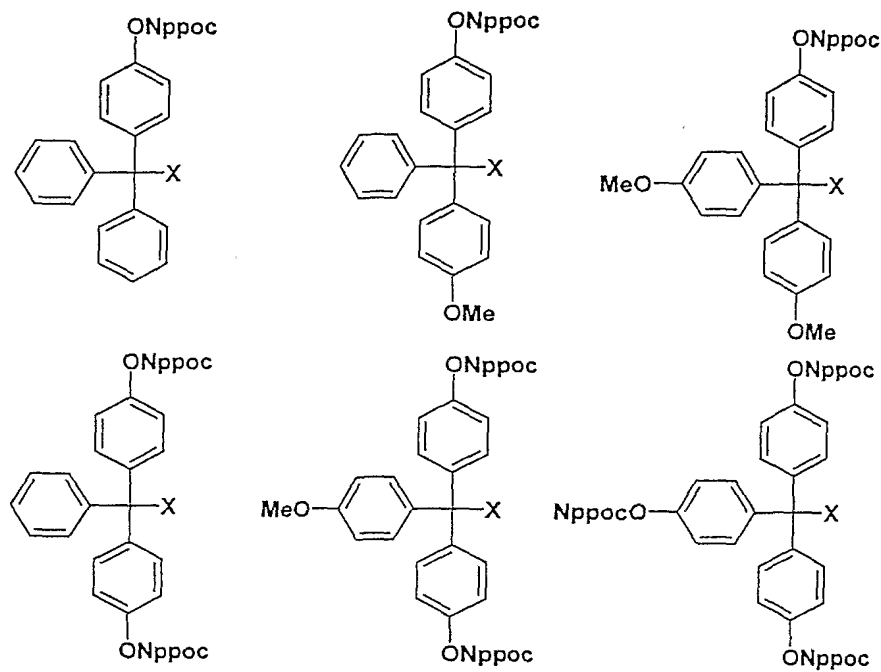
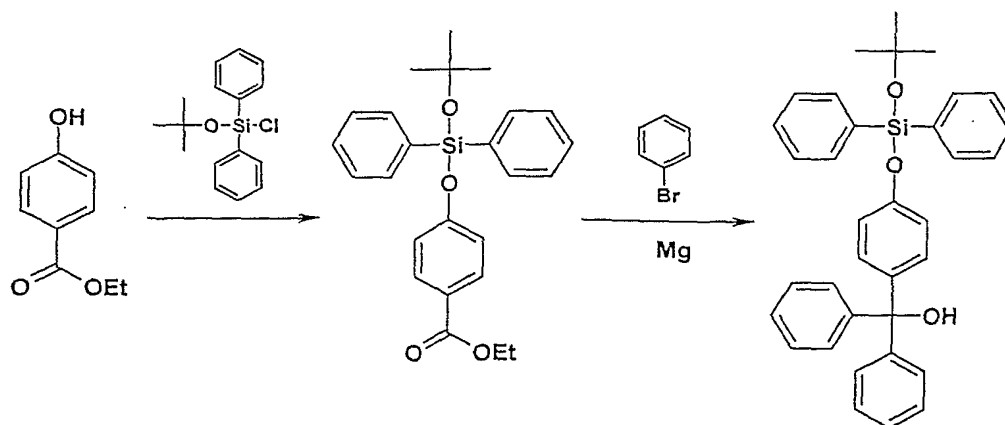
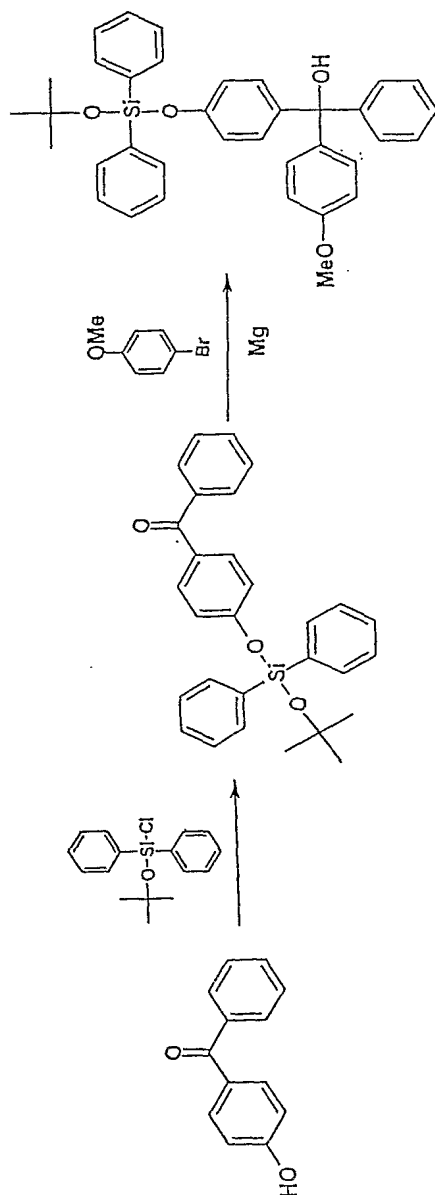


Abbildung 7



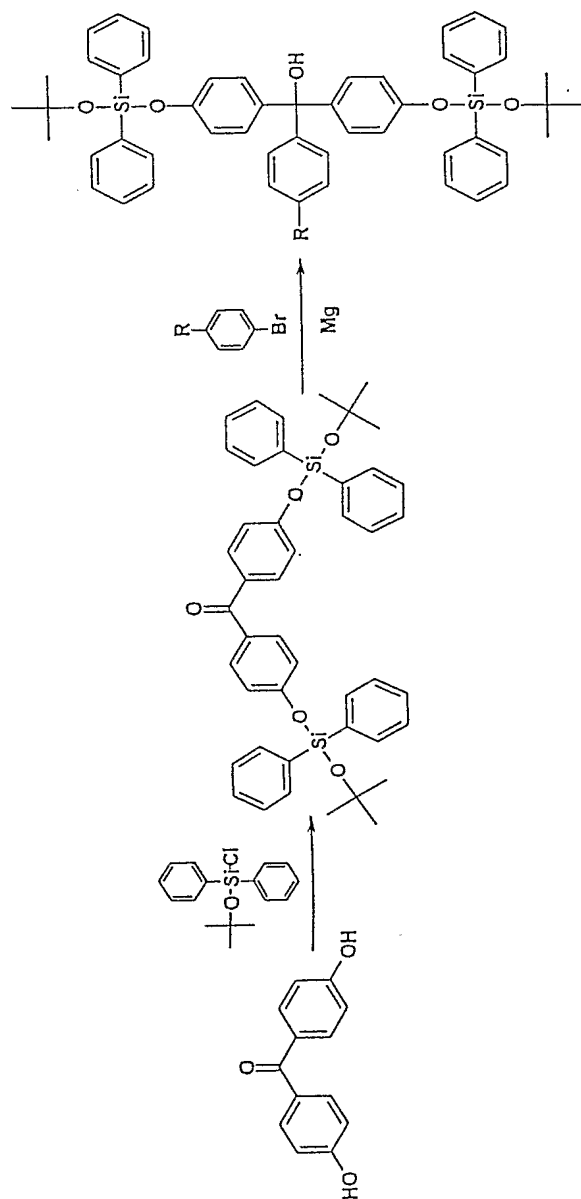
- 6/11 -

Abbildung 8 A



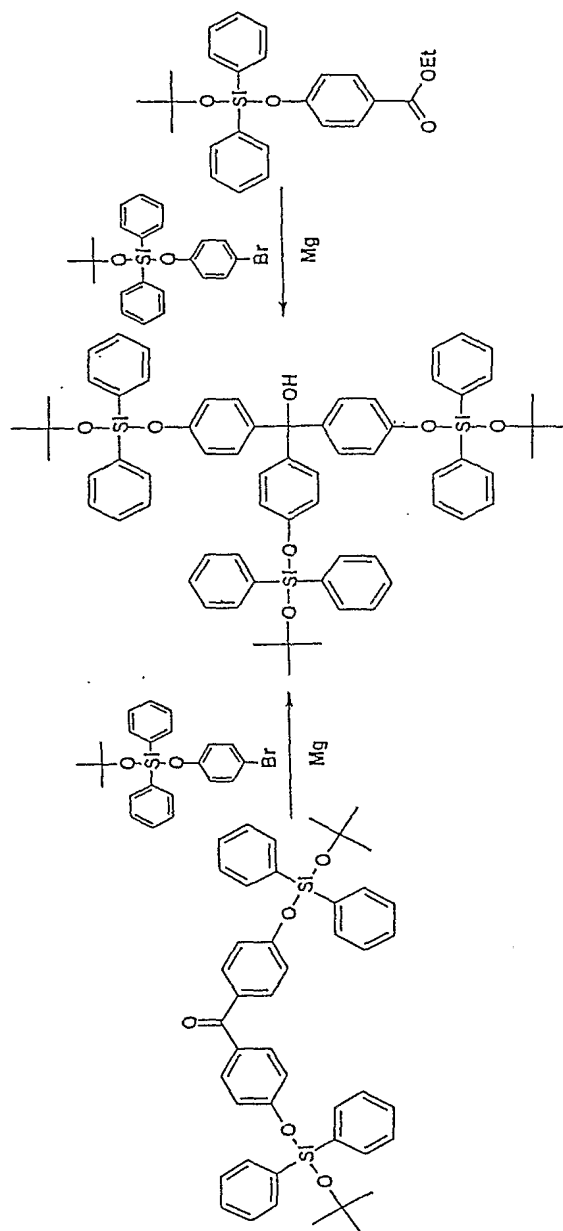
- 7/11 -

Abbildung 8 B



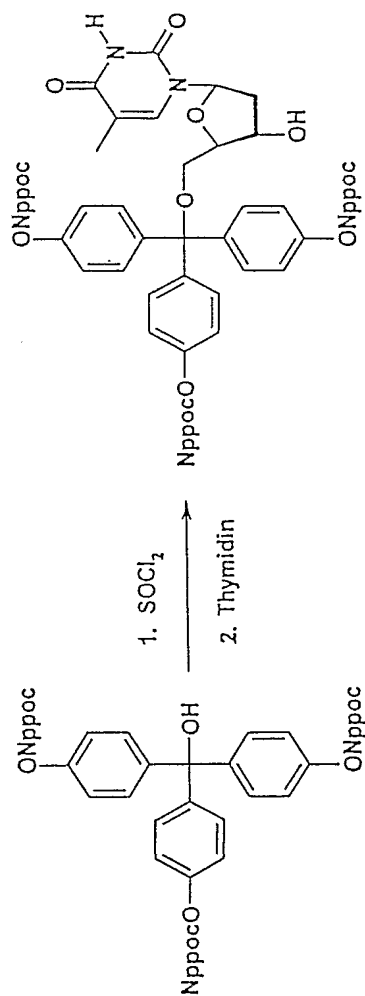
- 8/11 -

Abbildung 9



- 9/11 -

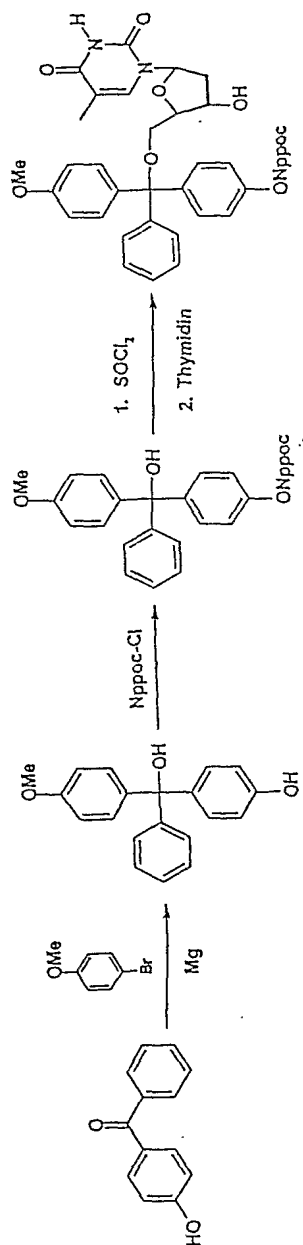
Abbildung 10





- 10/11 -

Abbildung 11



- 11/11 -

Abbildung 12

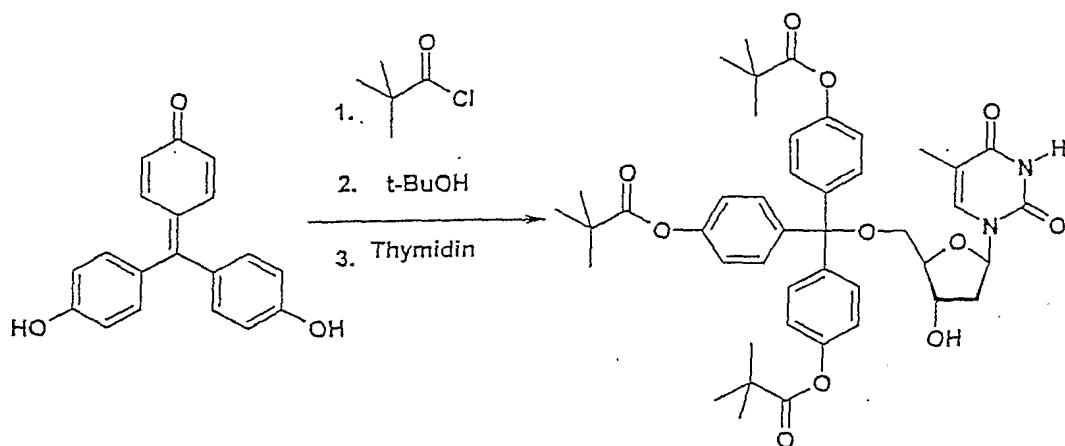
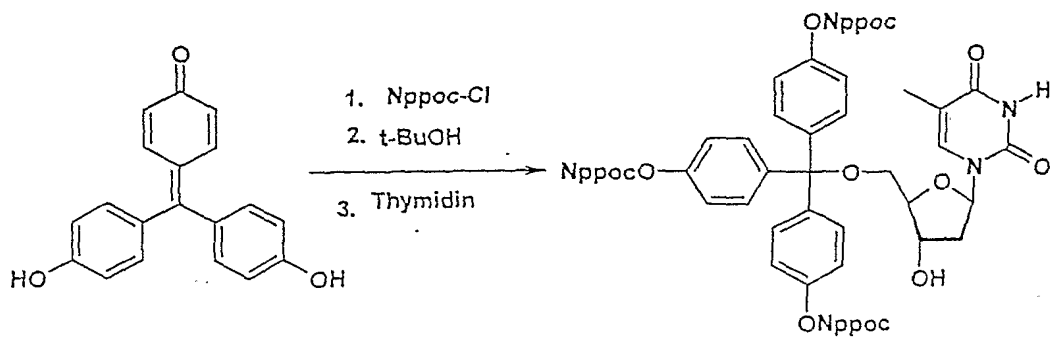


Abbildung 13



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP 02/07389

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07H19/06 C07H19/10 C07H19/16 C07H19/20 C07H21/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	E. HAPP, C. SCALFI HAPP: "New trityl-based protecting groups with a mild two-step removal" NUCLEOSIDES & NUCLEOTIDES, vol. 7, 1988, pages 813-816, XP008011020 the whole document	1-21
Y	US 5 763 599 A (PFLEIDERER WOLFGANG ET AL) 9 June 1998 (1998-06-09) abstract	1-21

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 November 2002

Date of mailing of the international search report

05/12/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

de Nooy, A

The current Claims 1-3 and 9-16 relate to an extremely large number of possible compounds, of which only a small portion are supported by the description (PCT Article 6) and/or can be regarded as having been disclosed in the application (PCT Article 5). In the present case the claims lack the proper support and the application lacks the requisite disclosure to such an extent that it appears impossible to carry out a meaningful search covering the entire range of protection sought. Therefore, the search was directed to the parts of the claims that appeared supported and disclosed in the above sense, that is the parts concerning the methods in which the two-stage protective group is a derivatized trityl group.

The applicant is advised that claims or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as International Preliminary Examining Authority the EPO generally will not carry out a preliminary examination for subjects that have not been searched. This also applies to cases where the claims were amended after receipt of the international search report (PCT Article 19) or where the applicant submits new claims in the course of the procedure under PCT Chapter II.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP 02/07389

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5763599	A	09-06-1998	
		DE 4444996 A1	20-06-1996
		AT 215957 T	15-04-2002
		AU 692658 B2	11-06-1998
		AU 4386596 A	03-07-1996
		BR 9510498 A	30-11-1999
		CA 2207912 A1	20-06-1996
		CZ 9701836 A3	17-12-1997
		DE 59510162 D1	16-05-2002
		DK 797580 T3	17-06-2002
		WO 9618634 A2	20-06-1996
		EP 0797580 A2	01-10-1997
		FI 973643 A	09-09-1997
		HU 77176 A2	02-03-1998
		IL 116407 A	13-09-2001
		JP 11501287 T	02-02-1999
		NO 972754 A	11-08-1997

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internatio Aktenzeichen

PCT/EP 02/07389

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C07H19/06 C07H19/10 C07H19/16 C07H19/20 C07H21/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C07H

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	E. HAPP, C. SCALFI HAPP: "New trityl-based protecting groups with a mild two-step removal" NUCLEOSIDES & NUCLEOTIDES, Bd. 7, 1988, Seiten 813-816, XP008011020 das ganze Dokument ----	1-21
Y	US 5 763 599 A (PFLEIDERER WOLFGANG ET AL) 9. Juni 1998 (1998-06-09) Zusammenfassung -----	1-21

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*&amp;\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

25. November 2002

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

05/12/2002

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

de Nooy, A

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 02/07389

## Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. ☒ Ansprüche Nr. 1-3, 9-16 (teilweise)  
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich  
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
3. ☐ Ansprüche Nr.  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

## Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

### Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 1-3, 9-16 (teilweise)

Die geltenden Patentansprüche 1-3, 9-16 beziehen sich auf eine unverhältnismäßig große Zahl möglicher Verfahren, von denen sich nur ein kleiner Anteil im Sinne von Art. 6 PCT auf die Beschreibung stützen und/oder als im Sinne von Art.5 PCT in der Patentanmeldung offenbart gelten kann. Im vorliegenden Fall fehlt den Patentansprüchen die entsprechende Stütze und fehlt der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Maße, daß eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich erscheint. Daher wurde die Recherche auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, welche im o.a. Sinne als gestützt und offenbart erscheinen, nämlich die Teile betreffend, die Verfahren in denen die zweistufige Schutzgruppe eine derivatisierte Tritylgruppe ist.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

International  
PCT/EP 02/07389

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5763599 A	09-06-1998	DE 4444996 A1	20-06-1996
		AT 215957 T	15-04-2002
		AU 692658 B2	11-06-1998
		AU 4386596 A	03-07-1996
		BR 9510498 A	30-11-1999
		CA 2207912 A1	20-06-1996
		CZ 9701836 A3	17-12-1997
		DE 59510162 D1	16-05-2002
		DK 797580 T3	17-06-2002
		WO 9618634 A2	20-06-1996
		EP 0797580 A2	01-10-1997
		FI 973643 A	09-09-1997
		HU 77176 A2	02-03-1998
		IL 116407 A	13-09-2001
		JP 11501287 T	02-02-1999
		NO 972754 A	11-08-1997